

# PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
in its capacity as elected Office

Date of mailing: 01 March 2001 (01.03.01)	
International application No.: PCT/JP00/05590	Applicant's or agent's file reference: YCT-501
International filing date: 21 August 2000 (21.08.00)	Priority date: 19 August 1999 (19.08.99)
Applicant: KATO, Yukio et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
08 September 2000 (08.09.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---





国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-501	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05590	国際出願日 (日.月.年) 21.08.00	優先日 (日.月.年) 19.08.99
出願人(氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 5 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。





## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79, C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79, C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2000年
日本国登録実用新案公報	1994-2000年
日本国実用新案登録公報	1996-2000年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)	EMBASE (STN)
MEDLINE (STN)	
BIOSIS (STN)	

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	ROSE, Timothy M. et al, 'Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97(melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence', Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. , 1986, Vol.83, No.5, pp1261-1265	16 1-12
Y A	FOOD, Michael R. et al, 'Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidyl-inositol-anchored protein', The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol.269, No.4, pp3034-40	16 5-7, 10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.11.00

国際調査報告の発送日

21.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信



4C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 6460



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	NAKAMASU, Kazuko et al, 'Membrane-bound transferrin-like protein(Mtf): structure, evolution and selective expression during chondrogenic differentiation of mouse embryonic cells', Biochimica et Biophysica Acta, 28.10.1999, Vol.1447, No.2-3, pp258-264	1-15
A	KAWAMOTO, Takeshi et al, 'Expression of membrane-bound transferrin-like protein p97 on the cell surface of chondrocytes', European Journal of Biochemistry, 1998, Vol.256, No.3, pp503-509	1-15
A	EP, 635518, A1 (HOECHST JAPAN LIMITED) 25.1月.1995(25.01.95) & JP, 7-82297, A	1-15
A	TRIPPEL, Stephen B, 'Growth factor actions on articular cartilage', The Journal of Rheumatology, 1995, No.22:1, Supplement43	9



本願の請求の範囲 1-10 に記載された発明は、MTf または MTf をコードする DNA を有効成分として含有する軟骨形成促進剤である。

本願の請求の範囲 11-12 に記載された発明は、MTf のアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤であり、有効成分が請求の範囲 1 に記載の MTf と異なり、さらに用途も請求の範囲 1 とは相反した軟骨の形成抑制に関するものであるため、請求の範囲 1-10 に記載の発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

本願の請求の範囲 13-15 に記載された発明は、MTf を活性化する物質のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られた物質、及び該物質を含む軟骨形成促進剤であり、当該発明は請求の範囲 1 に記載の発明である MTf を有効成分とする医薬とは異なるカテゴリーに属するスクリーニング方法の発明とその従属項であると認められるので、請求の範囲 1-10 に記載の発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

そして、本願の請求の範囲 16 に記載された発明は、GPI アンカー領域を欠損した MTf であるが、当該発明は用途等の特定がされていないタンパク質自体の発明であるため、請求の範囲 1 に記載された発明である医薬と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

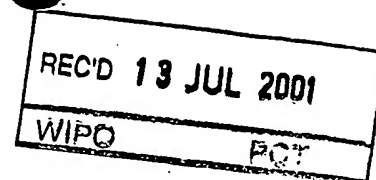




PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]



出願人又は代理人 の書類記号 YCT-501	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPO0/05590	国際出願日 (日.月.年) 21.08.00	優先日 (日.月.年) 19.08.99	
国際特許分類 (IPC) Int.Cl <sup>7</sup> A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79, C12Q1/02, G01N33/50, 33/15			
出願人 (氏名又は名称) 中外製薬株式会社			

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input checked="" type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input checked="" type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 08.09.00	国際予備審査報告を作成した日 27.06.01		
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 森井 隆信 電話番号 03-3581-1101 内線 6460	4C	2938



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |         |        |                      |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



## IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☐ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2. ☒ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

本願の請求の範囲11-12に記載された発明は、MTfのアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤であり、有効成分が請求の範囲1に記載のMTfと異なり、さらに用途も請求の範囲1とは相反した軟骨の形成抑制に関するものであるため、請求の範囲1-10に記載の発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

本願の請求の範囲13-15に記載された発明は、MTfを活性化する物質のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られた物質、及び該物質を含む軟骨形成促進剤であり、当該発明は請求の範囲1に記載の発明であるMTfを有効成分とする医薬とは異なるカテゴリーに属するスクリーニング方法の発明とその従属項であると認められるので、請求の範囲1-10に記載の発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

そして、本願の請求の範囲16に記載された発明は、GPIアンカー領域を欠損したMTfであるが、当該発明は用途等の特定がされていないタンパク質自体の発明であるため、請求の範囲1に記載された発明である医薬と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

- ☒ すべての部分
- ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ に関する部分



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-16	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-15	有
	請求の範囲	16	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-16	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: ROSE, Timothy M. et al, 'Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97(melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence', Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1986, Vol.83, No.5, pp1261-1265

文献2: FOOD, Michael R. et al, 'Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidyl-inositol-anchored protein', The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol.269, No.4, pp3034-3040

## 請求の範囲16について

文献1には、MTfタンパク質のアミノ酸配列が記載されている。

そして文献2には、MTfタンパク質はGPIアンカータンパク質であることが記載されている。

膜に局在するタンパク質において、その膜貫通ドメインや膜アンカードメインを適宜欠損させたタンパク質を調製してみることは当該技術分野の専門家が通常行うことであると認められるところ、文献1に記載のMTfタンパク質のアミノ酸配列から、文献2に記載のGPIアンカードメインを確認し、かつその欠損型を調製することは当該技術分野の専門家にとって自明である。

したがって、本願の請求の範囲16に係る発明は進歩性を有さない。





## Ⅶ. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 8, 14-15 について

本願の請求の範囲 8 には、「MT f を活性化する物質」と記載され、また請求の範囲 14-15 には、「請求項 13 記載の方法によって得られる MT f を活性化する物質」と記載されているが、当該物質として本願明細書において具体的に開示されているものは、実施例 2 に記載の CM 中に存在する物質のみであり、その他の当該活性をもつ物質については何ら記載されておらず、また本願出願時において、当該物質にどのようなものが含まれるかが当該技術分野の技術常識であったとも認められない。

したがって、本願明細書は、当該技術分野の専門家が本願の請求の範囲 8, 14-15 に係る発明のうち本願明細書に具体的に開示されているものを除く部分について、実施できる程度に記載されていない。



1.0T  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference YCT-501	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/05590	International filing date (day/month/year) 21 August 2000 (21.08.00)	Priority date (day/month/year) 19 August 1999 (19.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P 19/02, C07K 14/47, 14/79, C12Q 1/02, G01N 33/50, 33/15		
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 08 September 2000 (08.09.00)	Date of completion of this report 27 June 2001 (27.06.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP00/05590

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



## IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

The inventions set forth in Claims 11 and 12 of this application are chondral differentiation inhibitors containing an MTf antagonist, but the active ingredient is different from the MTf set forth in Claim 1, and concerns inhibiting chondrogenesis, which is the antithesis of the use set forth in Claim 1. Therefore, these inventions and the inventions set forth in Claims 1-10 do not constitute a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The inventions set forth in Claims 13-15 of this application concern a screening method for substances activating MTf, the substance activating MTf obtained by the above screening method, and chondrogenesis promoters containing the substance activating MTf obtained by the above screening method. This examination finds that the inventions concerning the screening method and its dependent claims belong to a different category than the medicine having MTf as its active ingredient, which is the invention set forth in Claim 1. Therefore, these inventions and the inventions set forth in Claims 1-10 do not constitute a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The invention set forth in Claim 16 of this application is MTf with the deletion of the GPI anchor domain, but because this invention is a protein in which the application and the like are not specified, this invention and the medicine that is the invention set forth in Claim 1 do not constitute a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. \_\_\_\_\_





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-15	YES
	Claims	16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Document 1: Rose, Timothy M., et al., "Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence," Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 83, No. 5, 1986, pp. 1261-1265

Document 2: Food, Michael R. et al., "Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidyl-inositol-anchored protein," The Journal of Biological Chemistry, Vol. 269, No. 4, 1994, pp. 3034-3040

#### Claim 16

Document 1 describes the amino acid sequence of the MTf protein.

Document 2 states that the MTf protein is a GPI anchored protein.

Because this examination finds that in the case of proteins localized on the cell membrane, it is conventional practice for persons skilled in the art to prepare proteins lacking the transmembrane domain or the membrane anchor domain as needed, it is obvious to persons skilled in the art to verify the GPI anchor domain described in document 2 from the amino acid sequence of the MTf protein described in document 1 and prepare the deleted form.

Therefore, the invention set forth in Claim 16 does not appear to involve an inventive step.



**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

In Claim 8 the phrase "substance activating MTf" is used, and in Claims 14 and 15 the phrase "substance activating MTf that is obtained by the method set forth in Claim 13" is used. The only substance specifically disclosed in the Specification as an example of this substance is the substance present in CM of Example 2, and there is no description of other substances having this activity. In addition, at the time of filing it was unclear from conventional knowledge in the art what kinds of substances are to be included in this definition.

Therefore, with the exception of the portions specifically disclosed in the Specification from among the inventions set forth in Claims 8, 14 and 15, the Specification does not contain sufficient description such that persons skilled in the art can work the invention.



**COURTESY COPY OF THE**

**INTERNATIONAL**

**PRELIMINARY**

**EXAMINATION REPORT**

**IN JAPANESE**



特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人 杜本 一夫
殿
あて名 〒 100-0004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所

P C T  
国際予備審査報告の送付の通知書  
(法施行規則第57条)  
[P C T規則71.1]

発送日  
(日.月.年) 10.07.01

出願人又は代理人 の書類記号 Y C T - 5 0 1	重要な通知	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 5 5 9 0	国際出願日 (日.月.年) 2 1 . 0 8 . 0 0	優先日 (日.月.年) 1 9 . 0 8 . 9 9
出願人 (氏名又は名称) 中外製薬株式会社		
<p>1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。</p> <p>2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。</p> <p>3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。</p> <p>4. 注 意</p> <p>出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（P C T 3 9 条（1））（様式P C T / I B / 3 0 1とともに国際事務局から送付された注を参照）。</p> <p>国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。</p> <p>この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。</p> <p>選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、P C T 出願人の手引き第Ⅱ巻を参照すること。</p>		

名称及びあて名 日本国特許庁（I P E A / J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員 特 許 庁 長 官 電話番号 03-3581-1101 内線 6460	4 C	2 9 3 8
---	---	-----	---------





## 注 意

### 1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒135-0016 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ビル

財団法人 日本特許情報機構 情報処理部業務課

TEL 03-3508-2313

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

- ### 2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）



25

特 許 協 力 条 約

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔P C T 36条及びP C T規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 Y C T - 5 0 1	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式P C T / I P E A / 4 1 6）を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 5 5 9 0	国際出願日 (日.月.年) 2 1 . 0 8 . 0 0	優先日 (日.月.年) 1 9 . 0 8 . 9 9
国際特許分類 ( I P C ) Int. Cl <sup>7</sup> A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79, C12Q1/02, G01N33/50, 33/15		
出願人 (氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (P C T 36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。  <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。 (P C T規則70.16及びP C T実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。  I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎  II <input type="checkbox"/> 優先権  III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成  IV <input checked="" type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如  V <input checked="" type="checkbox"/> P C T 35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明  VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献  VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備  VIII <input checked="" type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 0 8 . 0 9 . 0 0	国際予備審査報告を作成した日 2 7 . 0 6 . 0 1	
名称及びあて先 日本国特許庁 ( I P E A / J P ) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 森井 隆信	4 C 2 9 3 8
	電話番号 03-3581-1101 内線 6460	



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



## IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☐ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2. ☒ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

本願の請求の範囲11-12に記載された発明は、MTfのアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤であり、有効成分が請求の範囲1に記載のMTfと異なり、さらに用途も請求の範囲1とは相反した軟骨の形成抑制に関するものであるため、請求の範囲1-10に記載の発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

本願の請求の範囲13-15に記載された発明は、MTfを活性化する物質のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られた物質、及び該物質を含む軟骨形成促進剤であり、当該発明は請求の範囲1に記載の発明であるMTfを有効成分とする医薬とは異なるカテゴリーに属するスクリーニング方法の発明とその従属項であると認められるので、請求の範囲1-10に記載の発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

そして、本願の請求の範囲16に記載された発明は、GPIアンカー領域を欠損したMTfであるが、当該発明は用途等の特定がされていないタンパク質自体の発明であるため、請求の範囲1に記載された発明である医薬と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

- ☒ すべての部分
- ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ に関する部分





## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-16

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-15

有

請求の範囲

16

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-16

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: ROSE, Timothy M. et al, 'Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97(melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence', Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1986, Vol. 83, No. 5, pp1261-1265

文献2: FOOD, Michael R. et al, 'Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidyl-inositol-anchored protein', The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol. 269, No. 4, pp3034-3040

## 請求の範囲16について

文献1には、MTfタンパク質のアミノ酸配列が記載されている。

そして文献2には、MTfタンパク質はGPIアンカータンパク質であることが記載されている。

膜に局在するタンパク質において、その膜貫通ドメインや膜アンカードメインを適宜欠損させたタンパク質を調製してみることは当該技術分野の専門家が通常行うことであると認められるところ、文献1に記載のMTfタンパク質のアミノ酸配列から、文献2に記載のGPIアンカードメインを確認し、かつその欠損型を調製することは当該技術分野の専門家にとって自明である。

したがって、本願の請求の範囲16に係る発明は進歩性を有さない。



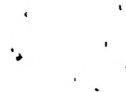
## Ⅶ. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 8, 14-15 について

本願の請求の範囲 8 には、「MT f を活性化する物質」と記載され、また請求の範囲 14-15 には、「請求項 13 記載の方法によって得られる MT f を活性化する物質」と記載されているが、当該物質として本願明細書において具体的に開示されているものは、実施例 2 に記載の CM 中に存在する物質のみであり、その他の当該活性をもつ物質については何ら記載されておらず、また本願出願時において、当該物質にどのようなものが含まれるかが当該技術分野の技術常識であったとも認められない。

したがって、本願明細書は、当該技術分野の専門家が本願の請求の範囲 8, 14-15 に係る発明のうち本願明細書に具体的に開示されているものを除く部分について、実施できる程度に記載されていない。



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79, C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79, C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN) EMBASE (STN)  
MEDLINE (STN)  
BIOSIS (STN)

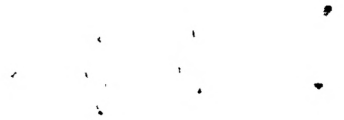
## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	ROSE, Timothy M. et al, 'Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97(melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence', Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. , 1986, Vol.83, No.5, pp.1261-1265	16 1-12
Y A	FOOD, Michael R. et al, 'Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidyl-inositol-anchored protein', The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol.269, No.4, pp.3034-40	16 5-7,10
PA	NAKAMASU, Kazuko et al, 'Membrane-bound transferrin-like protein(MTf): structure, evolution and selective expression during chondrogenic differentiation of mouse embryonic cells', Biochimica et Biophysica Acta, 28.10.1999, Vol.1447, No.2-3, pp.258-264	1-15
A	KAWAMOTO, Takeshi et al, 'Expression of membrane-bound transferrin-like protein p97 on the cell surface of chondrocytes', European Journal of Biochemistry, 1998, Vol.256, No.3, pp.503-509	1-15
A	EP, 635518, A1 (HOECHST JAPAN LIMITED),	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 07 November, 2000 (07.11.00)	Date of mailing of the international search report 21 November, 2000 (21.11.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>25 January, 1995 (25.01.95) &amp; JP, 7-82297, A</p> <p>TRIPPEL, Stephen B, 'Growth factor actions on articular cartilage', The Journal of Rheumatology, 1995, No.22:1, Supplement 43</p>	9





(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年3月1日 (01.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/13951 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P 19/02, C07K 14/47, 14/79, C12Q 1/02, G01N 33/50, 33/15
- (74) 代理人: 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05590
- (22) 国際出願日: 2000年8月21日 (21.08.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願平11/232966 1999年8月19日 (19.08.1999) JP
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加藤幸夫 (KATO, Yukio) [JP/JP]; 〒732-0062 広島県広島市東区牛田早稲田3-6-9-501 Hiroshima (JP). 藤本勝巳 (FUJIMOTO, Katsumi) [JP/JP]; 〒734-0036 広島県広島市南区旭1-3-11-202 Hiroshima (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CHONDROGENESIS PROMOTERS

(54) 発明の名称: 軟骨形成促進剤

(57) Abstract: Chondrogenesis promoters containing MTf; chondral differentiation inhibitors containing an MTf antagonist; a method of screening a substance activating MTf; the substance activating MTf obtained by the above screening method; chondrogenesis promoters containing the substance activating MTf obtained by the above screening method; and MTf with the deletion of the GPI anchor domain.

(57) 要約:

WO 01/13951 A1

MTf を含む軟骨形成促進剤、MTf のアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤、MTf を活性化する物質のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られる MTf を活性化する物質、該スクリーニング方法によって得られる MTf を活性化する物質を含む軟骨形成促進剤、ならびに GPI アンカー領域を欠損した MTf を提供する。



## 明細書

## 軟骨形成促進剤

技術分野

- 5      本発明は新規な軟骨形成促進剤に関する。さらに詳しくは、膜結合型トランスフェリン様蛋白（membrane-bound transferrin-like protein：以下において MTF ということもある）を含む軟骨形成促進剤に関する。

従来技術

- 10      動物の軟骨組織は軟骨細胞（chondrocytes）と細胞間基質（matrix）により構成されている。軟骨組織は胎生期の骨格の大部分を占めており、出生後は内軟骨性骨化により、骨組織に置き換わってゆく。内軟骨性骨化を開始するにあたって、軟骨細胞は静止軟骨細胞から増殖軟骨細胞となり、ついで肥大性軟骨細胞に分化していく（文献；津田ら編集「骨の科学」1982年、東京医歯薬出版、p.11～
- 15 29）。このように軟骨細胞は特に成長期の骨組織形成にとって必要な細胞であることがよく知られてきた。しかし軟骨細胞の分化や内軟骨性骨化についてはまだ未解明の領域が多い。

- 軟骨細胞膜には独自の糖蛋白が存在し、その膜蛋白が他の結合組織の細胞とは異なる軟骨細胞の特徴（球形の細胞形態、軟骨マトリックスの大量分泌、軟寒天内での生存、増殖など）に寄与している可能性がある。この仮説に基づいて、ヤン（Yan）ら（Yan et al. ; J. Biol. Chem., vol.265, p.10125～10131, 1990）及び
- 20 加藤ら（加藤ら、日本骨代謝学会雑誌、vol.10, No.2, p.187～192, 1992）は種々のレクチンの軟骨細胞の分化、増殖に対する効果を調べ、中でもタチナタマメレクチンであり  $\alpha$ -D-マンノース残基および  $\alpha$ -D-グルコース残基に親和性を
- 25 有するコンカナバリン A（concanavalin A：以下において Con A ということもある）が軟骨細胞の分化を協力的に促進することを、プロテオグリカン（proteoglycan）の合成を増大させることなどを指標として明らかにしている。Con A で処理された軟骨細胞は、未熟な扁平形態から分化した球形に変化し、軟骨細胞の分化マーカーであるプロテオグリカン及び I I 型コラーゲン産生、アルカリホスファター

ゼなどの発現、さらには石灰化を誘導する。このような分化誘導作用は他のレクチンでは見られない。

河本ら (Kawamoto et al., Eur. J. Biochem. vol.256, p.503-509, 1998) はさらに、Con A の作用を仲介するレセプターを探索する試みの中で、軟骨細胞上に存在する約 20 種類の Con A 結合蛋白のうちで、レチノイン酸処理した軟骨細胞 (脱分化し、Con A 反応性を消失する) において発現が低下する 76 kDa の蛋白 (p 76) に注目した。ウサギ軟骨細胞膜分画より Con A アフィニティーカラムクロマトグラフィーにて p 76 を精製した後、N 末部分アミノ酸配列を決定、遺伝子をクローニングした。アミノ酸配列及びその cDNA の核酸配列から、p 76 は、ヒトのメラノーマなどの腫瘍に高発現されている腫瘍抗原として知られていたメラノトランスフェリン (p 97) と 86 % のアミノ酸同一性を示し、そのカウンターパートであると考えられた。従来、p 97 の生理的機能は不明であり、その発現も腫瘍細胞でのみ高く、正常組織ではほとんど検出されないと報告されていた。

p 76 は Con A との結合性から軟骨細胞の分化あるいはその機能発現に関与していることが推定されたが、これらのタンパク質が実際に軟骨細胞又はその前駆細胞にどのような影響を及ぼすかについては何ら確認されていなかった。

本発明の目的は、軟骨細胞の分化に関連する物質を明らかにし、さらにはこれを用いた新規な軟骨形成促進剤を提供することである。本発明は、軟骨細胞の機能の制御、及びゆくゆくは骨形成の促進をつかさどる物質の発明につながるものであり、このような物質は新しいタイプの軟骨代謝性疾患および骨代謝性疾患の治療、予防、診断につながるものである。

#### 発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために、鋭意研究した結果、膜結合型トランスフェリン様蛋白 (membrane-bound transferrin-like protein : MTf) 遺伝子を、軟骨細胞への分化能を保持しているが、無刺激ではほとんど分化しないマウス ATDC 5 細胞株に導入して過剰発現させたところ、軟骨への分化を著しく誘導することを見出して本発明を完成した。

すなわち、本発明は、膜結合型トランスフェリン様蛋白 (MTf) を含む軟骨形成促進剤を提供する。

- MTfとしては、ウサギ p 7 6 タンパク質、ヒト p 9 7 タンパク質、マウス MTf タンパク質及び p 7 6 タンパク質もしくは p 9 7 タンパク質もしくはマウス MTf
- 5 タンパク質をコードするDNAとストリンジेंटな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列を有し、かつ MTf 活性を有するタンパク質が好ましく、特にヒト p 9 7 タンパク質が好ましい。

MTfは以下のものから選択されるのが特に好ましい：

- 1) 配列番号：2のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- 10 2) 配列番号：4のアミノ酸配列を有するタンパク質
- 3) 配列番号；15のアミノ酸配列を有するタンパク質及び
- 4) 配列番号：2又は4又は15のタンパク質をコードするDNAとストリンジेंटな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列を有し、かつ MTf 活性を有するタンパク質。
- 15 本発明はさらに、MTfがそのGPIアンカー領域を欠損したものである前記軟骨形成促進剤を提供する。

本発明の軟骨形成促進剤は MTf を活性化する物質及び／又はインスリンと併用するとさらに効果が高められる。

- 本発明の軟骨形成促進剤は、以下の疾患に有用である：OA（変形性関節症）；
- 20 RA（リウマチ様関節炎）；外傷による関節軟骨損傷；自家軟骨細胞移植における軟骨細胞の形質維持；耳、気管、鼻の軟骨の再建；離断性骨軟骨炎；椎間板、半月板の再生；骨折及び軟骨からの骨形成。

- 本発明はさらに、以下のいずれかのタンパク質をコードするDNAが組み込まれた発現ベクターを有効成分として含有する、軟骨形成を促進するための遺伝子
- 25 治療剤を提供する：

- 1) 配列番号：2のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- 2) 配列番号：4のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- 3) 配列番号；15のアミノ酸配列を有するタンパク質及び
- 4) 配列番号：2又は4又は15のタンパク質をコードするDNAとストリンジ

ェントな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされるアミノ酸配列を有し、かつ MTf 活性を有するタンパク質；

4) 上記 1)、2)、3) 又は 4) 記載のタンパク質から G P I アンカー領域を欠損させたタンパク質。

5 本発明はさらに、MTf のアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤を提供する。

MTf のアンタゴニストは、抗 MTf 抗体又は MTf をコードする核酸にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体であることが好ましい。

10 本発明はさらに、以下の工程を含む、MTf を活性化する物質のスクリーニング方法を提供する：

1) 軟骨細胞への分化能を保持しているが、無刺激ではほとんど分化しない細胞に MTf を過剰発現させた細胞株を調製し、；

2) 候補物質を工程 1) で調製した細胞株に添加して一定期間培養し；そして

15 3) 軟骨細胞の分化誘導について細胞株を観察して、候補物質から MTf を活性化する物質を選択する。

本発明はさらに、上記方法によって得られる MTf を活性化する物質を提供する。

本発明はさらに、上記方法によって得られる MTf を活性化する物質を含む軟骨形成促進剤を提供する。

本発明はさらに、G P I アンカー領域を欠損した MTf を提供する。

20

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、MTf 強制発現 ATDC5 変異株の作製手順の概略を示す。

図 2 は、ATDC5 細胞変異株における MTf 遺伝子の発現を示す Northern blotting の図である（電気泳動の写真）。

25 図 3 は、ATDC5 細胞変異株における MTf タンパクの発現を示す Western Blotting の図である（電気泳動の写真）。

図 4 は、インスリン非存在下における、対照細胞（pC-1）と MTf 過剰発現株（Full-1 および Full-5）の細胞播種 29 日目での軟骨細胞への分化の様子を示す写真（生物の形態を示す写真）である。

図5は、インスリン存在下における、対照細胞(pC-1)と MTf 過剰発現株(Full-1 および Full-5)の細胞播種 29 日目での軟骨細胞への分化の様子を示す写真(生物の形態を示す写真)である。

図6は、ウサギ軟骨細胞の培養上清添加の軟骨細胞分化誘導に及ぼす効果を示す写真(生物の形態を示す写真)である。

図7は、アンチセンス MTf RNA の過剰発現、及びインスリン存在下と非存在下におけるアグリカンの合成抑制を示す RT-PCR Southern Blotting の結果を示す図である。

#### 10 発明を実施するための最良の形態

本発明において、膜結合型トランスフェリン様蛋白(MTf)とは、Con A と結合する軟骨細胞膜上のタンパク質であって、かつトランスフェリンのような鉄結合サイトを有するタンパク質をいう。さらに好ましくは、Con A による軟骨分化誘導を仲介する機能を有するタンパク質をいう。

15 MTf という用語は従来、メラノーマなどの腫瘍に高発現されている腫瘍抗原として知られていたメラノトランスフェリン(p 97)の略語として使用されていたが、p 97 が癌組織以外に軟骨で特に高レベルで発現しており、癌組織に特異的でないことが判明したので、本発明者らは MTf (membrane-bound transferrin-like protein) に対して MTf という用語を再命名した。

20 本発明において、MTf 活性とは、未分化な細胞に対して軟骨分化を誘導し、軟骨細胞に対してその機能発現を促進する活性をいう。

MTf の例としては、ウサギ p 76 タンパク質、ウサギ p 76 タンパク質のヒト相同体タンパク質である p 97 タンパク質、マウス MTf タンパク質ならびにこれらのタンパク質のアミノ酸の一部を欠失、置換、付加したものであって、MTf 活性を有するタンパク質、あるいは p 76 タンパク質もしくは p 97 タンパク質もしくはマウス MTf タンパク質をコードする DNA とストリンジントな条件下(例えば、標準的な方法としては、文献(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されているように、6xSSC, 0.5% SDS, 10mM EDTA, 5xDenhardt's solution, 10mg/ml

denatured salmon sperm DNA の溶液中で 68℃ でハイブリダイゼーションを行う) でハイブリダイズする DNA によってコードされるアミノ酸配列を有し、かつ MTF 活性を有するタンパク質が挙げられるが、これに限定されない。

ウサギ p 76 タンパク質は、ヒト p 97 タンパク質と相同であり、ウサギ p 97 と称されることもある (Kawamoto et al., Eur. J. Biochem. vol.256, p.503-509, 1998)。その塩基配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号: 1 及び 2 に示す。ヒト p 97 タンパク質の塩基配列及びアミノ酸配列も公知である (Rose, T.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1261-65, 1986)。その塩基配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号: 3 及び 4 に示す。マウス MTF タンパク質は文献 (Biochim. Biophys. Acta, 1047:258-264, 1999) に記載されており、その塩基配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号: 14 及び 15 に示す。これらの MTF タンパク質は種間での相同性が高く、マウス-ヒトでは 83%、マウス-ウサギでは 82%、ヒト-ウサギでは 86% のアミノ酸の同一性がある。

p 76 / p 97 タンパク質は、C 末端アミノ酸のカルボキシル基に糖脂質 GPI (グリコシルホスファチジルイノシトール) を結合し、これをアンカーとして膜につなぎ止められている、GPI アンカー型タンパク質である (p 76 については、尾田 良、広島大学歯学雑誌、29 巻、1 号、40-57, 1997; p 97 については Alemany, R. et al., J. Cell Science, 104, 1155-62, 1993)。後述する実施例で示すように、全長の MTF のみならず、GPI アンカー部分を欠損した MTF あるいは可溶性の MTF であっても、MTF を発現していない細胞でこれを発現させると軟骨分化誘導活性が確認された。従って、本発明では、このような可溶性の MTF、好ましくは GPI アンカー欠損型 MTF も軟骨形成調節剤として使用できる。なお、GPI アンカー欠損型 MTF とは、GPI アンカー部分の一部又は全てが欠損した可溶性 MTF をいい、例えばウサギ MTF の場合には、C-末端の GPI アンカー結合に必要な 28 残基を欠失した MTF、ヒト MTF 及びマウス MTF では、C-末端の GPI アンカー結合に必要な 30 残基を欠失した MTF が挙げられる。

本発明で使用する MTF は天然型であっても組換え型であってもよく、それぞれ当業界に公知の方法で入手できる。以下に例示する。

#### 天然型



- MTfを得るには、例えば特開平7-82297号に記載の方法により軟骨細胞から得ることができる。簡単に述べると、軟骨細胞の材料としては、種々の動物の軟骨組織を使うことができるが、例えばウサギの肋軟骨成長板を材料として、加藤らの方法（Kato et al. ; J. Cell Biol., vol. 100, p.477~485, 1985）に従い、
- 5 プロテアーゼ及びコラゲナーゼ処理により軟骨細胞を得ることができる。この分離された軟骨細胞は培養皿でウシ胎児血清（FCS）を含む培地で5%CO<sub>2</sub>、95%空気の環境下で37℃で培養できる。この軟骨培養細胞を回収しホモジナイザーで破碎し、17%/40%のショ糖平衡密度勾配による沈降平衡遠心により、膜蛋白を分取することができる。得られた膜蛋白画分を直接にコンカナバリン
- 10 A・アフィニティカラムに展開するか、または、あらかじめコンカナバリンA以外のレクチンに結合する膜蛋白を除くために、例えば、代表的なレクチンである小麦胚芽レクチン（Wheat germlectin）のアフィニティカラムに一旦展開した後、コンカナバリンA・アフィニティカラムに展開する等の方法を使うことにより、コンカナバリンA結合蛋白画分をさらに分取することができる。この得られたコ
- 15 ンカナバリンA結合蛋白の軟骨細胞に対する特異性は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により、これらの分画を比較することで検討できる。目的とする軟骨細胞に特異的な糖蛋白質が特定できたらゲルから目的のバンドを切り出し、エレクトロエリ्यूション等により抽出精製し、エンドグリコシダーゼを用いて糖蛋白質の糖質を分析できる。

## 20 組換え型

組換え型 MTf は、本発明の実施例に記載の方法あるいはこれに準じた方法を用いて、MTf 遺伝子を組み込んだプラスミドを宿主細胞にトランスフェクションして、MTf タンパク質を発現させることにより得ることができる。

- しかし、これに限定されることなく、当業界で公知の種々の形質転換方法、宿
- 25 主細胞を使用することができる。例えば、MTf をコードする遺伝子を適当なベクターに組み込むことにより、原核細胞または真核細胞の宿主細胞を形質転換することができる。

さらに、これらのベクターに適当なプロモーターや形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現することが可能

である。また、目的とする遺伝子に他のポリペプチドをコードする遺伝子を連結して、融合タンパク質として発現させ、精製を容易にしたり、発現量を上げたり、また精製工程において適当な処理を施すことにより、目的タンパク質を切り出すことも可能である。

- 5 一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子で知られているように、多形現象を示すと考えられ、この多形現象によって1個またはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあれば、塩基配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。

- また、配列表の配列番号2又は4又は15のアミノ酸配列中の1個またはそれ  
10 以上のアミノ酸を欠くかまたは付加したポリペプチド、あるいはアミノ酸が1個またはそれ以上のアミノ酸で置換されたポリペプチドでも細胞周期調節活性を有することがある。例えば、ヒトインターロイキン2（IL-2）遺伝子のシステインに相当する塩基配列をセリンに相当する塩基配列に変換して得られたポリペプチドがIL-2活性を保持することも既に公知になっている（Wang et al.,  
15 Science 224:1431, 1984）。これらのMTfタンパク質をコードする遺伝子の改変体を作製する技術は当業者には公知である。

- また、真核細胞で発現させた場合、その多くは糖鎖が付加され、アミノ酸を1個ないしそれ以上変換することにより糖鎖付加を調節することができるが、この  
場合でも軟骨細胞分化誘導活性を有することがある。それゆえ、本発明ではMTf  
20 タンパク質をコードする遺伝子を人工的に改変したものを用いて、得られたポリペプチドが軟骨細胞分化誘導活性を有する限り、それらのポリペプチドをコードする遺伝子はすべて本発明に使用できる。

発現ベクターは、複製起源、選択マーカー、プロモーター、RNAスプライス部位、ポリアダニル化シグナルなどを含むことができる。

- 25 発現系に用いる宿主のうち原核生物宿主細胞としては、例えば、大腸菌、枯草菌などが挙げられる。また、真核生物のうち、真核微生物の宿主細胞としては、例えばイースト、粘菌が挙げられる。あるいは、Sf9などの昆虫細胞を宿主細胞として使用してもよい。さらに、動物細胞由来の宿主細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞などが挙げられる。

以上のようにして MTf タンパク質をコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養することにより産生されたタンパク質は細胞内または細胞外から分離し、精製することができる。なお、上述した配列表の配列番号 2 又は 4 又は 15 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子で得られたタンパク質のみならず、配列表の配列番号 2 又は 4 又は 15 に示すアミノ酸配列の一部を置換、欠失もしくは付加したアミノ酸配列をコードする塩基配列、あるいはこれらにハイブリダイズする塩基配列を含む遺伝子を用いて得られたタンパク質であっても MTf タンパク質の生物学的機能、即ち細軟骨細胞分化誘導活性を有する限りは本発明の軟骨形成促進剤に使用できる。

- 10      なお、MTf タンパク質の分離、精製には通常のタンパク質で用いられる分離、精製方法を使用することができる。例えば、各種クロマトグラフィー、限外濾過、塩析、透析などを適宜選択、組み合わせて使用することができる。

本発明の軟骨形成促進剤は、上述した MTf をタンパク質の形で投与してもよく、あるいは遺伝子治療として使用することも可能である。

- 15      また、軟骨分化物質としては従来インスリンあるいはインスリン様成長因子が知られていたが、本発明の軟骨形成促進剤はインスリンの非存在下においても軟骨分化を誘導した。ただし、インスリンの存在下ではその効果がさらに強く観察されたので、MTf とインスリンあるいはインスリン様成長因子を併用することにより、軟骨修復作用をさらに強化することが期待できる。

- 20      さらに、軟骨細胞培養上清を添加すると、MTf 過剰発現株で著しい軟骨細胞の分化が観察され、軟骨細胞培養上清に MTf を活性化する物質が存在することが示唆された。従って、MTf と MTf を活性化する物質を併用することにより、軟骨修復作用をさらに強化することが期待できる。

MTf を活性化する物質は例えば以下の方法によって取得することができる：

- 25      1) 軟骨細胞培養系の培養上清から精製する；  
2) MTf と結合するタンパク質の cDNA を軟骨細胞 cDNA ライブラリーからクローニングする；  
3) イースト two hybrid 法で MTf と結合するタンパク質の cDNA をクローニングする。

また、種々の候補物質から MTf を活性化する物質をスクリーニングするには以下の工程を含む方法を用いることができる：

- 1) 軟骨細胞への分化能を保持しているが、無刺激ではほとんど分化しない細胞に MTf を過剰発現させた細胞株を調製し、；
- 5    2) 候補物質を工程 1) で調製した細胞株に添加して一定期間培養し；そして
- 3) 軟骨細胞の分化誘導について細胞株を観察して、候補物質から MTf を活性化する物質を選択する。

このようにして得られる MTf 活性化物質はそれ自体として軟骨形成促進剤に使用できる。

- 10    さらに、可溶性 MTf、好ましくは G P I アンカー領域を欠損した MTf は、MTf を発現していない細胞中で発現させると軟骨分化が誘導された。従って、可溶性 MTf、好ましくは G P I アンカー領域を欠損した MTf は軟骨形成調節剤に使用できる。

本発明の軟骨形成促進剤が適用できる疾患には以下のものが挙げられる：

- 15    1) O A (変形性関節症)
- 2) R A (リウマチ様関節炎)
- 3) 外傷による関節軟骨損傷
- 4) 自家軟骨細胞移植における軟骨細胞の形質維持
- 5) 耳、気管、鼻の軟骨の再建
- 20    6) 離断性骨軟骨炎
- 7) 椎間板、半月板の再生
- 8) 骨折
- 9) 軟骨からの骨形成

- 25    本発明の軟骨形成促進剤は一般には、MTf タンパク質もしくは MTf 変異体 (改変体) を導入した遺伝子治療として使用するのに有用である。本発明の遺伝子治療剤には、以下のいずれかのタンパク質をコードする DNA が組み込まれた発現ベクターを有効成分として含有する：

- 1) 配列番号：2 のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- 2) 配列番号：4 のアミノ酸配列を有するタンパク質；

- 3) 配列番号 ; 1 5 のアミノ酸配列を有するタンパク質及び  
4) 配列番号 : 2 又は 4 又は 1 5 のタンパク質をコードする DNA とストリンジ  
エントな条件下でハイブリダイズする DNA によってコードされるアミノ酸配列  
を有し、かつ MTF 活性を有するタンパク質 ;  
5) 上記 1) 、 2) 、 3) 又は 4) 記載のタンパク質から GPI アンカー領域を  
欠損させたタンパク質。

MTF 変異体をコードする DNA は、例えば部位特異的突然変異誘発や PCR 法  
(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edt., 15 章, Cold Spring  
Harbor Laboratory Press(1989)、PCR A Practical Approach, IRL Press 200-  
210(1991)) 等の手法により、当業者ならば容易に作製することができる。

本発明における細胞導入用の DNA として、MTF あるいは MTF 変異体発現ベ  
クターを用意する。発現ベクターは、MTF あるいは MTF 変異体をコードする D  
NA を、例えば pSG5 (ストラタジーン社) 等の発現ベクターに連結すること  
により作製できる。次に、上記の導入用 DNA 混合物を細胞内に導入する。細胞  
としては、例えば骨髄間質細胞、線維芽細胞、骨膜細胞、軟骨膜細胞、滑膜細胞、  
脱分化した軟骨細胞が挙げられる。細胞への DNA の導入法としては、例えばリ  
ン酸カルシウム法 (横田崇・新井賢一編、遺伝子導入と発現・解析法、羊土社、  
1994) が挙げられる。従って、該 DNA を医薬の有効成分とすることにより、軟  
骨形成促進作用を有する遺伝子治療剤を調製することができる。このような遺伝  
子治療剤を投与すると、細胞内で MTF またはその変異体が高発現し、該細胞内  
における軟骨の分化誘導作用を促進することが考えられる。従って本発明の MTF  
遺伝子治療剤は、前記した各種疾患の治療又は予防剤となる。

本発明の遺伝子治療剤を細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターを  
利用した遺伝子導入方法、あるいは非ウイルス性の遺伝子導入方法 (日経サイエ  
ンス, 1994 年 4 月号, 20-45 頁、実験医学増刊, 12(15)(1994)、実験医学別冊「遺伝  
子治療の基礎技術」, 羊土社 (1996) ) のいずれの方法も適用することができる。

ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては、例えばレトロウイルス、ア  
デノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、  
ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等の DNA ウイルス、又

はRNAウイルスに、MTf あるいは変異 MTf をコードするDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法（DNAワクチン法）、リポソーム法、リポフェクティン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

また本発明の遺伝子治療剤を実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入する *in vivo* 法、およびヒトからある種の細胞を取り出し体外でDNAを該細胞に導入し、その細胞を体内に戻す *ex vivo* 法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48（1994）、実験医学増刊、12(15)(1994)）。*in vivo* 法がより好ましい。

*in vivo* 法により投与される場合は、疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、関節内注射、関節軟骨欠損部に直接塗布、埋め込み（パテ、ポリ乳酸など）、関節内徐放剤などの方法で投与できるが、静脈内注射も可能である。*in vivo* 法により投与する場合は、一般的には注射剤等とされ、必要に応じて慣用の担体を加えてもよい。また、リポソームまたは膜融合リポソームにした場合は、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤とすることができる。

また、GPIアンカーを含まない可溶性タンパク質（GPIアンカー欠損型MTf）あるいは前述したMTf活性化物質の場合には、これらの投与法に加えて、タンパク質自体を種々の投与方法で投与することができ、さらにはこれを軟骨前駆細胞に添加することでも分化を誘導しうられる。

本発明の軟骨形成促進剤の投与量は、治療すべき疾患の種類、重症度や患者の年齢、体重などを考慮して、具体的には医師により決定される。GPIアンカーを含まない可溶性タンパク質（GPIアンカー欠損型MTf）あるいは前述したMTf活性化物質の場合には、一般的には1ng～1000mg/日、好ましくは1μg～100mg/日である。

本発明はさらに、MTfのアнтаゴニストを含む軟骨分化抑制剤を提供する。MTfのアнтаゴニストとしては、抗MTf抗体又はMTfの塩基配列に基づいたアンチセンスDNA等を挙げることができる。

アンチセンスDNAは、MTfをコードする核酸にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体である。

アンチセンスDNAは、mRNAに対して相補的塩基配列をもち、mRNAと塩基対を形成することにより、遺伝情報の流れを遮断し、最終産物であるMTfの合成を抑制する。本発明において使用できるアンチセンスDNAは、配列表の  
5 配列番号2又は4又は15に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列と特異的にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチドである。

ここで「オリゴヌクレオチド」の語は、天然に存在する塩基および本来のホスホジエステル結合によって結合した糖部分から生成されたオリゴヌクレオチドおよびその類似体を意味する。したがって、この用語が含む第1の群は、天然に存在する種または天然に存在するサブユニットまたはそれらの同族体から生成された合成種である。また、サブユニットとは隣接するサブユニットに対してホスホジエステル結合または他の結合によって結合した塩基-糖の組み合わせをいう。またオリゴヌクレオチドの第2の群はその類似体であり、これはオリゴヌクレオチドと同様に機能するが、天然に存在していない部分を有する残基を意味する。  
10 これらには、安定性を増加するためにリン酸基、糖部分、3'，5'末端に化学修飾を施したオリゴヌクレオチドを含む。例えば、ヌクレオチド間のホスホジエステル基の酸素原子の1つを硫黄に置換したオリゴホスホロチオエート、-CH<sub>3</sub>に置換したオリゴメチルホスホネートなどが挙げられる。また、ホスホジエステル結合は、非イオン性かつ非キラル性である他の構造で置換されていてもよい。  
20 さらに、オリゴヌクレオチド類似体としては、修飾された塩基形態、すなわち天然に通常見いだされるもの以外のプリンおよびピリミジンを含む種を用いてもよい。

本発明で使用するオリゴヌクレオチドは、好ましくは5～40個、さらに好ましくは8～30個、より好ましくは12～30個のサブユニットを有する。  
25

本発明においては、オリゴヌクレオチドがハイブリダイズするmRNAの標的部分は転写開始部位、翻訳開始部位、イントロン/エキソン結合部位または5'キャップ部位が好ましいが、mRNAの二次構造を考慮して立体障害のない部位を選択すべきである。

さらに、本発明においてはオリゴヌクレオチドに代えて、ペプチド核酸(例えば、Bioconjugate Chem. Vol.5, No.1, 1994 を参照) を用いることもできる。

本発明の特に好ましい態様は、配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列とハイブリダイズし、MTf の発現を阻害しうるオリゴヌクレオチド又はペプチド核酸である。

本発明によるオリゴヌクレオチドは、当業界で公知の合成法、例えば Applied Biosystems 社などの合成装置を用いる固相合成法によって製造できる。同様の方法を用いて、他のオリゴヌクレオチド類似体、例えば、ホスホロチオエートやアルキル化誘導体を製造することもできる(村上 章ら、「機能性アンチセンス DNA の化学合成」、有機合成化学、48 (3): 180-193, 1990)。

本発明で使用する MTf のアンタゴニストとしては、アンチセンス DNA である上記のような長さのオリゴヌクレオチドに限定されない。内在性の MTf の産生を抑制するものであれば、より長いヌクレオチド、好ましくは 500~600 ヌクレオチドのアンチセンスをゲノムに組み込むことによって、軟骨細胞の分化抑制に使用できる(実施例 3 参照)。

本発明で使用する抗 MTf 抗体は、配列番号 2 又は 4 又は 15 に示すアミノ酸配列のうち、少なくとも 5 個の連続するアミノ酸を有するペプチドを認識する抗体であり、定法(例えば、新生化学実験講座 1、タンパク質 I、p. 389-397、1992 参照)を用いて、抗原となる配列表の配列番号 2 又は 4 又は 15 に示すアミノ酸配列のうち、少なくとも 5 個の連続するアミノ酸を有するペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗体にはポリクローナル及びモノクローナル抗体を含み、これらの作製方法も当業者に公知である。

本発明を以下の実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されない。当業者には種々の変更、修飾が可能であり、これらも本発明の範囲に含まれる。

## 実施例

### 実験材料および方法



### ウサギ軟骨細胞の培養

- 軟骨細胞は加藤らの方法 (Kato et al.; J. Cell Biol., vol. 100, p.477~485, 1985) に準じてウサギ肋軟骨から単離した。すなわち、生後4週齢の雄性日本白色家兎 (広島実験動物) の肋骨の静止軟骨部を分離し、メスにて細切した後、
- 5 8mg/mL アクチナーゼ E (科研製薬) と 5%ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM、Flow Laboratories 社) にて1時間、0.15%コラゲナーゼ (Worthington Biochemical 社) を含む DMEM にて3時間インキュベートした後、120  $\mu$ m ナイロンフィルターを通過する細胞を回収した。本細胞を細胞培養用プラスチックシャーレー (Corning 社) に播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 気相下に
- 10 て 10%ウシ胎児血清 (三菱化成)、50  $\mu$ g/mL アスコルビン酸、50U/mLG カリウム、60  $\mu$ g/mL カナマイシン (以上、明治製薬)、250  $\mu$ g/mL アンホテリシン B (ICN Biochemical 社) を含むアルファ変法イーグル培地 ( $\alpha$ -MEM、三光純薬) (medium A) または、無血清の DMEM (medium B) 中で培養した。

### 15 マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 の培養

- ATDC5 は理研細胞銀行 (筑波、日本) より購入した。細胞は 5%ウシ胎児血清 (FCS 三菱化成)、10  $\mu$ g/mL ヒトトランスフェリン (Boehringer Mannheim 社) および 0.3nmol/mL 亜セレン酸ナトリウム (和光純薬) を含むハム F-12 培地 (Flow Laboratories 社) とダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM、Flow
- 20 Laboratories 社) を 1:1 で混合した培地 (維持培地) にて、37℃、5%CO<sub>2</sub> 気相下で培養した。軟骨分化を誘導する場合は、この維持培地に 10  $\mu$ g/mL ウシインスリン (Sigma 社) を加えた培地 (分化培地) で ATDC5 細胞を培養した。

### ウサギ MTf の cDNA クローニングと塩基配列の決定

- 25 コンフルエントに達して3日後のウサギ軟骨細胞からグアニジンチオシアネート法によって total RNA を抽出した。そしてヒト MTf (Rose, T.M. et al., Pro NAS 83, 1261-65, 1986) の塩基配列に基づいて 5'-GGCTGGAACGTGCCCCGTGGGCTA-3' (forward) (配列番号: 5)、5'-GTCCTGGGCCTTGTCCAGCAGTC-3' (reverse) (配列番号: 6) のプライマー

対を設計し、total RNA 1  $\mu$ g から reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法によって 1.5kb の Mtf cDNA 断片を増幅した。得られた cDNA 断片を pBluescript II SK ベクター (Stratagene 社) の SmaI 切断部に組み込んでクローン化し、Sequenase7-deaza-dGTP DNA sequencing kit (USB 社) を用いて塩基配列を決定した。次に完全長の cDNA を得るために Marathon cDNA amplification kit (Clontech 社)を用いて rapid amplification of cDNA end (RACE)を行った。具体的にはウサギ軟骨細胞の 2 本鎖 total cDNA に Marathon cDNA アダプターをライゲーションして、アダプタープライマーと上記で判明した Mtf の塩基配列より設計した特異的プライマー (5'-AGAGGGGACTCCGAGTATCTGGTCTC-3' (forward) (配列番号: 7) と 5'-GTCCGGCCCCGACACCAACATCTTC-3'(reverse) (配列番号: 8)) を用いて RACE を行った。この増幅された cDNA サンプルを 4.5%アクリルアミドゲルにて分離して、その cDNA の主要バンドをゲルから抽出し、pBluescript II SK ベクターに組み込んでクローン化した。それらをテンプレートとして Sequenase7-deaza-dGTP DNA sequencing kit および ABI autosequencer (ABI 社) を用いて、Mtf 全長の塩基配列を決定した。

#### Mtf 強制発現 ATDC5 変異株の作製

ウサギ Mtf cDNA (Kawamoto T. et al., EJB 1998) の全長あるいは C-末端の GPI アンカー結合に必要な 28 残基に対応する部位を削除したものを pcDNA3.1/Zeo (+)プラスミド発現ベクター (サイトメガロウイルス極初期プロモーター/エンハンサーを含む: Invitrogen 社、San Diego, CA) に組み込んだ。すなわち、全長を含む EcoRI-NotI フラグメントをベクターより切り出し、pcDNA3.1/Zeo (+)の EcoRI-NotI 部位に組み込んだ。また、GPI アンカー結合部位を欠失した変異株を作製するには、PCR 法により C-末端の 28 アミノ酸手前にストップコドン挿入したフラグメントを作製し、配列の確認を行った後、pcDNA3.1/Zeo (+)の EcoRI-NotI 部位に組み込んだ。

このようにして全長の Mtf cDNA (Mtf Full) と GPI アンカーの欠失した Mtf cDNA (Mtf(-)GPI) を挿入したプラスミド (pMtf Full あるいは pMtf (-)GPI)

を作製し、それぞれ ATDC5 細胞（理研、筑波、日本）にトランスフェクションした。トランスフェクションには SuperFect Transfection Reagent (QIAGEN) を用いた。ゼオシン（Zeocin:Invitrogen 社）により選択し、安定なトランスフォーマントを作製した。

- 5 具体的には、ATDC5 細胞を 10 cm シャーレに  $2 \times 10^5$  個の細胞を播種して、翌日、導入するプラスミド DNA を各  $2 \mu\text{g}$  (pMTf Full 及び pMTf(-)GPI) と SuperFect Transfection Reagent 溶液  $\sim 40 \mu\text{L}$  をそれぞれ個別に無血清培地に溶解した後、要時速やかに混合して、無血清培地にて洗浄した細胞に添加した。37℃、5%CO<sub>2</sub> 気相下で 1 時間培養後、血清培地を添加してさらに 1 日間培養した。なお、  
10 対照としてベクターのみをトランスフェクションした群も作製した。

トランスフェクション 1 日後、ゼオシンを  $50 \mu\text{g/mL}$  含んだ血清添加培地で選択を開始し、2 日おきに培地交換を行いながら 2 週間培養した。その結果、MTf Full および MTf(-)GPI を安定に発現する ATDC5 細胞変異株を得て、以後はゼオジンを  $50 \mu\text{g/mL}$  含んだ血清添加培地で継代した。

- 15 なお、MTf 強制発現 ATDC5 変異株の作製手順の概略を図 1 に示す。

#### ATDC5 細胞変異株のウサギ MTf 遺伝子の発現

- ATDC5 細胞変異株のウサギ MTf 遺伝子の発現は Northern blotting にて確認した。具体的には ATDC5 変異株よりグアニジンチオシアネート法によって total  
20 RNA を調製し、total RNA  $10 \mu\text{g}$  を  $2.2\text{mol/L}$  ホルムアルデヒドを含有する 1% アガロースゲル中にて電気泳動した後、Hybond-N membrane (Amersham 社) に転写した。このメンブレンを <sup>32</sup>P でラベルした 2.2kb のウサギ MTf cDNA プロープで 42℃、16 時間ハイブリダイズした。メンブレンを洗浄後、BioMax X-ray film (Kodak 社) に -80℃ で露光してシグナルを検出した。得られた結果を図 2  
25 に示す。

その結果、MTf Full 株においてはクローンナンバー 1、4 および 5 においてウサギ MTf 遺伝子が強発現していることを確認した。

また、MTf(-)GPI 株においてはクローンナンバー 3、3N、8、9 および 10 においてウサギ MTf 遺伝子が強発現していることを確認した。実施例では

(-)GPI-3 を使用した。

#### ATDC5 細胞変異株のウサギ MTf タンパクの発現

ATDC5 細胞変異株のウサギ MTf タンパクの発現は Western Blotting にて確認した。具体的には ATDC5 変異株より膜画分タンパクを調製して、10  $\mu$ g/lane  
5 で SDS-PAGE を行い、polyvinylidene difluoride membraen (Milipore 社)に転写した。転写したメンブレンは 4%スキムミルクでブロッキングした後、抗 MTf 血清 (1:500 希釈 ; Eur. J. Biochem. 256, 503-509 (1998)) で 4℃、14 時間反応させた後、<sup>125</sup>I ヒツジ抗マウス IgG(Fab')<sub>2</sub> フラグメント (Amersham 社) で室温、  
10 2 時間反応させた。メンブレンを洗浄後、BioMax X-ray film に -80℃ でエクスポーズして解析を行った。得られた結果を図 3 に示す。

その結果、MTf Full 株においてはクローンナンバー 1 および 5 においてウサギ MTf タンパクが強発現していることを確認した。これらのクローンを MTf 過剰発現株 ( Full -1 および Full-5) と命名した。

15

#### 実施例 1 : MTf 過剰発現株における軟骨分化

MTf 過剰発現株を 6 穴マルチウエルプレートに  $4.0 \times 10^4$  個の細胞を播種して、維持培地にて 37℃、5%CO<sub>2</sub> 気層下で培養した。

MTf 過剰発現株は MTf Full 株において MTf の遺伝子とタンパクの発現を確認した Full -1 および Full-5 株について検討した。MTf(-)GPI 株においては、MTf  
20 の遺伝子の発現を確認した GPI-3 株について検討した。

対照細胞として、ATDC5 細胞及び pC-1 (ベクターのみ) を同様に調製し、顕微鏡で形態学的特徴を観察した。なお、細胞形態は、オリンパス位相差顕微鏡を用いて観察した。一つの培養系から 2 視野を写真にとり、少なくとも 200 個の  
25 細胞を数えて、球形化した細胞の割合を算定した。

インスリン非存在下では対照細胞 (pC-1) は軟骨細胞に分化しないのに対して、MTf 過剰発現株 ( Full -1 および Full-5) 及び MTf(-)GPI 株 (-)GPI-3) は 20 日以内に分化を開始し、細胞播種 29 日目には細胞のほぼ全域が軟骨細胞に分化した (図 4)。

さらに、インスリン (10(g/mL) 存在下 (Day 0 より添加) で、同様の試験を行った。インスリン非存在下のときと同様な結果が得られた (図 5) が、MTf 過剰発現株では、インスリン非存在下よりもさらに分化が誘導された。すなわち、インスリン非存在下よりも多くの細胞の細胞形態が軟骨細胞様に "round" していた。

これらの結果から、MTf は軟骨の分化誘導を促進する効果があることが明らかとなり、その効果はインスリンの非存在下でも示された。

#### 実施例 2 : ウサギ軟骨細胞の培養上清添加の効果

- 10      ウサギ軟骨細胞の培養上清は静止軟骨細胞  $1 \times 10^6$  個の細胞を 10cm カルチャーディッシュに播種し、medium A (10mL) にて 37℃、5%CO<sub>2</sub> 気相下で培養した。コンフルエント後 2 日目に無血清の medium B (5mL) に交換して 24 時間後に、培養上清 (CM) を回収して実験に供した。なお、CM は回収後 5% になるようにウシ胎児血清を添加した。
- 15      MTf 過剰発現株 (Full-5) および対照株 (pC-1) の細胞を、6 穴マルチウエルプレートに各  $8.0 \times 10^4$  個/well になるように細胞を播種して、維持培地にて 37℃、5%CO<sub>2</sub> 気相下で培養した。コンフルエントに達した 3 日後 (Day 7) より、先に回収した CM を全体の培養液の 60% になるように添加し、同時に 10  $\mu$ g/mL ウシインスリンを添加して 37℃、5%CO<sub>2</sub> 気相下でさらに 48 時間培養した。
- 20      CM 添加開始 48 時間後、CM を添加した MTf 過剰発現株 (Full-5(+))CM) はほぼすべての細胞が軟骨細胞に分化し、基質合成の盛んな敷石状の軟骨細胞の形態を示した。これに対し、CM 非添加の MTf 発現株 (Full-5(-))CM) は、対照細胞であるベクターのみを発現させた細胞株 (pC-2(+))CM) および (-)CM) とほぼ同じ細胞形態を示した。ベクターのみを発現させた細胞株では CM 添加による軟
- 25      骨細胞の分化誘導は認められなかった (図 6)。

これらの結果は CM 中に MTf を活性化する物質が存在すること意味する。

#### 実施例 3 : アンチセンス MTf RNA の過剰発現による軟骨分化

MTf 強制発現 ATDC5 変異株の作製に用いたのと同様の方法によって、マウス

アンチセンス MTf RNA を過剰発現させた ATDC5 細胞変異株 (A-01, A-05, A-08, A-09, A-11, A-12, A-23, A-24) を作製した。なお、マウスアンチセンス MTf RNA は、PCR (primer 5'-GGTGTGTTGAGGGGCGTGGACTCT-3' (配列番号: 9) 及び 5'-TCACCAACGGCTTTGAGCACATCAC-3' (配列番号: 10) を使用) で  
5 マウス MTf の cDNA 断片を増幅し、それを pGEM-T Easy Vector (Promega) に組み込んだ後 ApaI-NotI で切り出して pcDNA3.1/Zeo(+) の ApaI-NotI 部位に組み込んだ (逆方向に挿入されていることになる) ものをを用いた。増幅された部分の配列を配列番号: 11 に示す。

10 なお、対照としてベクターのみをトランスフェクションした群も作製した (pC-1)。

ノザンブロットでマウス MTf アンチセンスの発現を観察した。ノザンブロットに用いたプローブは上記で用いた ApaI-NotI 断片である。

軟骨細胞の分化抑制効果は、軟骨プロテオグリカンであるアグリカンの合成抑制を指標にし、インスリン (4 日目から添加量 10 $\mu$ g/mL で添加した) の存在下と  
15 非存在下において、RT-PCR Southern Blotting により試験した。具体的には、各クローンの細胞からグアニジンチオシアネート法によって total RNA を抽出した。この total RNA 1 $\mu$ g から SUPERScript pre-amplification system キット (Life Technologies 社) を用いて 1 本鎖 cDNA を合成した。cDNA をテンプレートとして、アグリカン遺伝子に対しては 5'-TGCTACTTCATCGACCC-3' (forward) (配列番号: 12)、5'-AAAGACCTCCCCTCCATCT-3' (reverse) (配列番号: 13) のプライマー対を用いて PCR を行った。この PCR 反応液を 1% アガロースゲル中にて電気泳動した後、Hybond-N membrane (Amersham 社) に転写した。このメンブレンを <sup>32</sup>P でラベルしたアンチセンス MTf プローブ及び  
20 マウスアグリカン cDNA プローブで 42 $^{\circ}$ C、16 時間ハイブリダイズした。メンブレンを 0.5% SDA 含有 0.2XSSC で洗浄後、BioMax X-ray film (Kodak 社) に -80 $^{\circ}$ C  
25 で露光してシグナルを検出した。

得られた結果を図 7 に示す。アンチセンス MTf RNA は、変異細胞株 A-12 (レーン 6) で最も強く、次いで A-11 (レーン 5) で強く発現していた。これと対応して、アグリカンの遺伝子発現は変異細胞株 A-12 (レーン 6) で最も強く抑制さ

れ、次いで A-11（レーン 5）で強く抑制された。アグリカン遺伝子発現の抑制効果はインスリンの非存在下でも観察されたが、インスリン存在下ではさらに抑制効果は強くなった。

## 請求の範囲

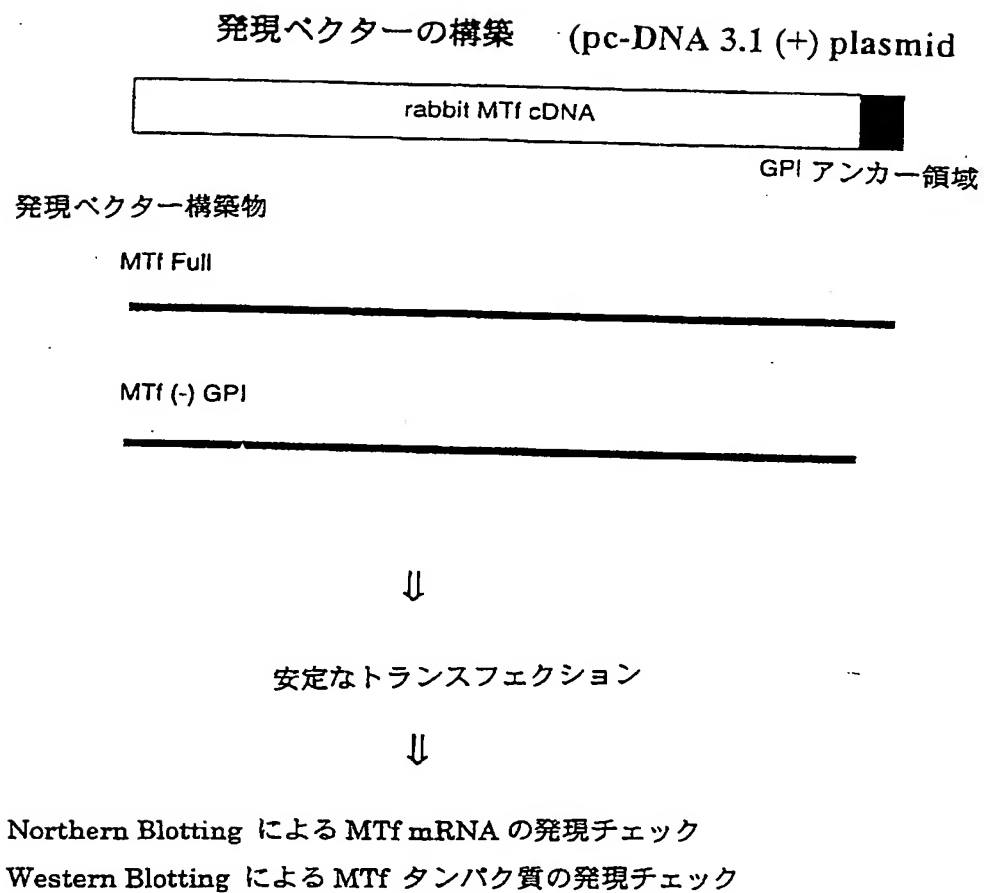
1. 膜結合型トランスフェリン様蛋白 (MTf) を含む軟骨形成促進剤。
2. MTf がウサギ p 7 6 タンパク質、ヒト p 9 7 タンパク質、及び p 7 6 タン
- 5    パク質もしくは p 9 7 タンパク質をコードする DNA とストリンジエントな条件  
下でハイブリダイズする DNA によってコードされるアミノ酸配列を有し、かつ  
MTf 活性を有するタンパク質からなる群より選択される請求項 1 記載の軟骨形  
成促進剤。
3. MTf が以下のものから選択される請求項 1 記載の軟骨形成促進剤：
  - 10    1) 配列番号：2 のアミノ酸配列を有するタンパク質；
  - 2) 配列番号：4 のアミノ酸配列を有するタンパク質；
  - 3) 配列番号；1 5 のアミノ酸配列を有するタンパク質及び
  - 4) 配列番号：2 又は 4 又は 1 5 のタンパク質をコードする DNA とストリンジ  
エントな条件下でハイブリダイズする DNA によってコードされるアミノ酸配列
  - 15    を有し、かつ MTf 活性を有するタンパク質。
4. MTf がヒト p 9 7 タンパク質である請求項 2 記載の軟骨形成促進剤。
5. 可溶性 MTf を含む軟骨形成調節剤。
6. 可溶性 MTf がその G P I アンカー領域を欠損したものである、請求項 5 記  
載の軟骨形成調節剤。
- 20    7. 以下のいずれかのタンパク質をコードする DNA が組み込まれた発現ベク  
ターを有効成分として含有する、軟骨形成を促進するための遺伝子治療剤：
  - 1) 配列番号：2 のアミノ酸配列を有するタンパク質；
  - 2) 配列番号：4 のアミノ酸配列を有するタンパク質；
  - 3) 配列番号；1 5 のアミノ酸配列を有するタンパク質及び
  - 25    4) 配列番号：2 又は 4 又は 1 5 のタンパク質をコードする DNA とストリンジ  
エントな条件下でハイブリダイズする DNA によってコードされるアミノ酸配列  
を有し、かつ MTf 活性を有するタンパク質；
  - 5) 上記 1)、2)、3) 又は 4) 記載のタンパク質から G P I アンカー領域を  
欠損させたタンパク質。



8. MTf を活性化する物質と併用する請求項 1 記載の軟骨形成促進剤。
9. インスリンあるいはインスリン様成長因子と併用する請求項 1 記載の軟骨形成促進剤。
10. OA (変形性関節症) ; RA (リウマチ様関節炎) ; 外傷による関節軟骨損傷 ; 自家軟骨細胞移植における軟骨細胞の形質維持 ; 耳、気管、鼻の軟骨の再建 ; 離断性骨軟骨炎 ; 椎間板、半月板の再生 ; 骨折及び軟骨からの骨形成からなる群より選択される軟骨分化が関与する骨疾患を治療するための請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の軟骨形成促進剤。
11. MTf のアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤。
12. MTf のアンタゴニストが抗 MTf 抗体又は MTf をコードする核酸にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド類似体である請求項 11 記載の軟骨分化抑制剤。
13. 以下の工程を含む、MTf を活性化する物質のスクリーニング方法 :
- 1) 軟骨細胞への分化能を保持しているが、無刺激ではほとんど分化しない細胞に MTf を過剰発現させた細胞株を調製し、 ;
- 2) 候補物質を工程 1) で調製した細胞株に添加して一定期間培養し ; そして
- 3) 軟骨細胞の分化誘導について細胞株を観察して、候補物質から MTf を活性化する物質を選択する。
14. 請求項 13 記載の方法によって得られる MTf を活性化する物質。
15. 請求項 13 記載の方法によって得られる MTf を活性化する物質を含む軟骨形成促進剤。
16. GPI アンカー領域を欠損した MTf。

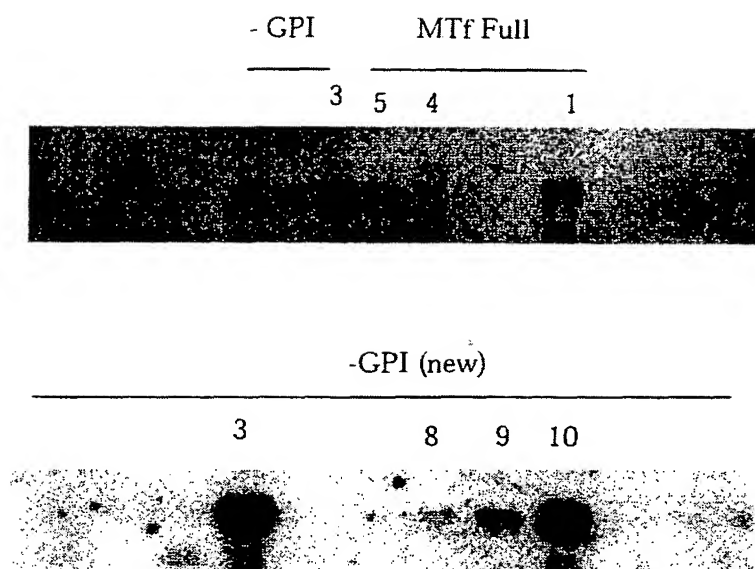


図1

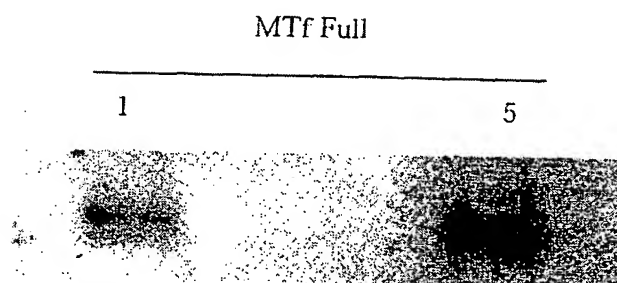




☒ 2.

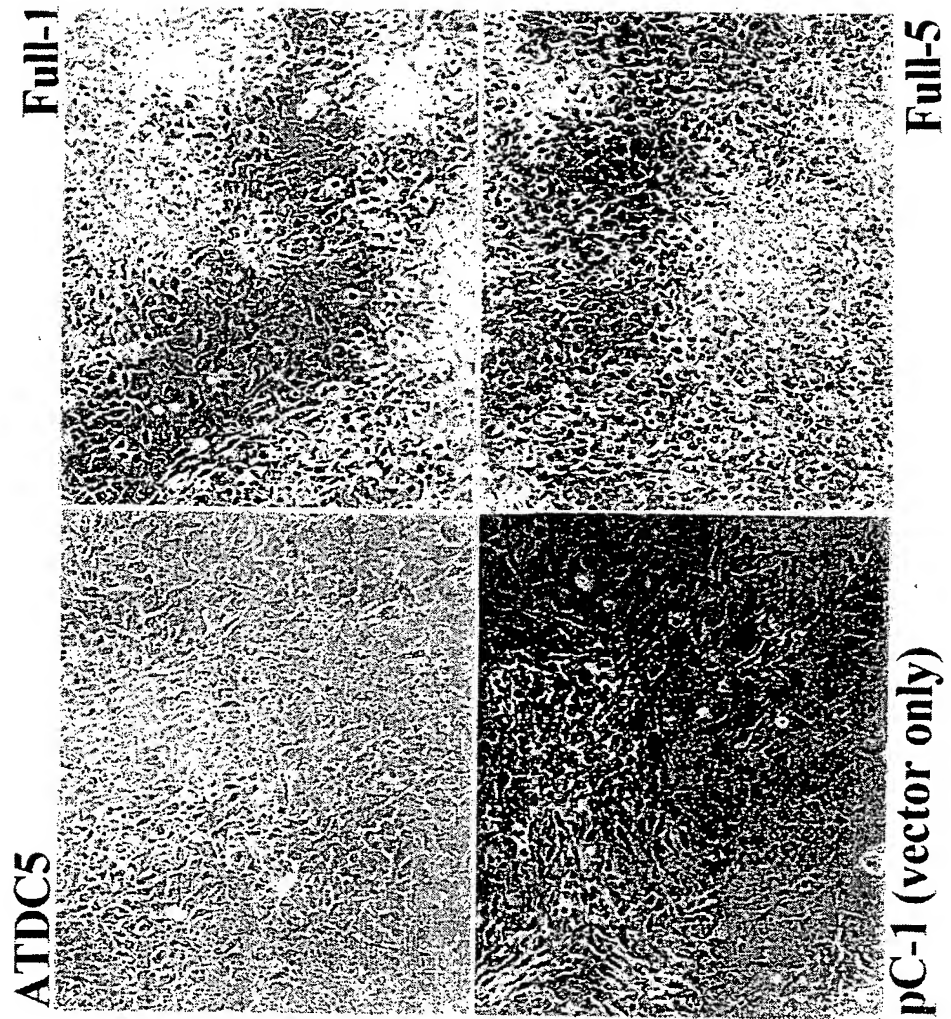


☒ 3





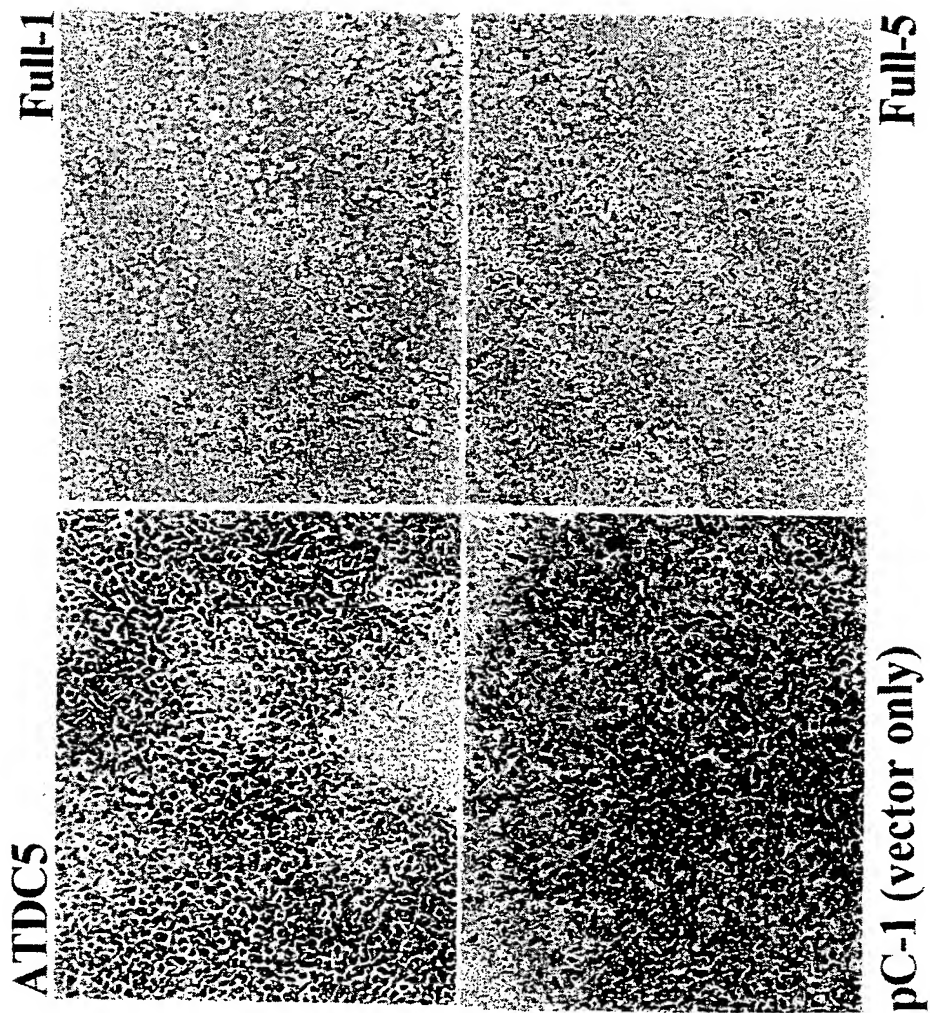
☒ 4





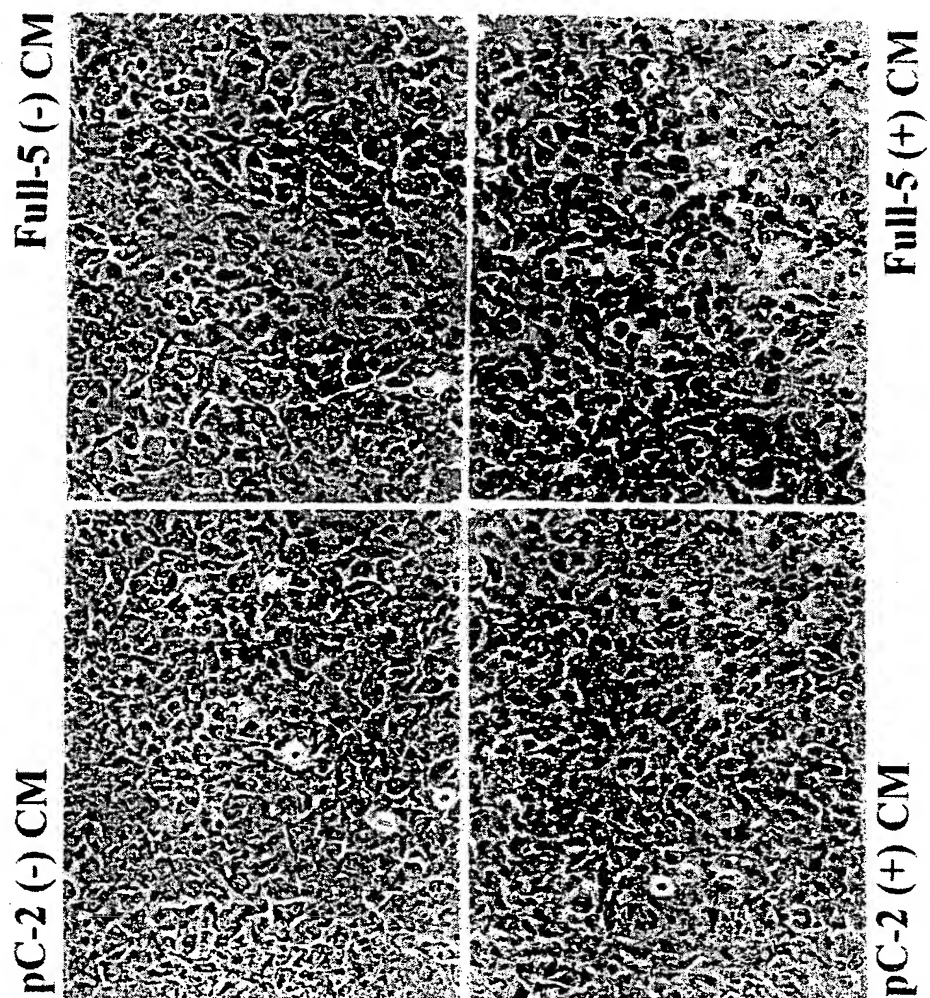


☒ 5





☒ 6





アンチセンス

1 2 3 4 5 6 7 8



アンチセンス MTf RNA

(-)インスリン 23日目



アグリカン

(+)インスリン 17日目



アグリカン

1 2 3 4 5 6 7 8 9

- 1 = A-01
- 2 = A-05
- 3 = A-08
- 4 = A-09
- 5 = A-11
- 6 = A-12
- 7 = A-23
- 8 = A-24
- 9 = pC-1



## 【配列表】

&lt;110&gt; 中外製薬株式会社

&lt;120&gt; 軟骨形成促進剤

&lt;130&gt; YCT-501

&lt;160&gt; 15

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2388

&lt;212&gt; cDNA

&lt;213&gt; Rabbit

&lt;400&gt; 1

```

gccgccgtc acicgttcgc acicggatic agaccacgic cgacccccctg gactgcgccca 60
tgcgggtgccg aagcgcggct atgtggatct tccitggccct gcgcaccgca ctccggcagcg 120
tggaggtagcg gtggtagcacc gcgtccgagc ccgagcagca gaagtgcgag gacatgagcc 180
aggccttccg cgaagccggc ctccagccccg cccitgctgtg cgtgcagggc acctcggccg 240
accactgcgt ccagctcatc gcggcccacg aggccgacgc catcactctg gacggaggag 300
ccatttacga ggccggggaag gaacacggcc tgaagcccgt ggtgggcgaa gtgtatgacc 360
aagaggtaggg caccctctac tacgtctgtg ccgtgggtcaa gaggagctcc aacgtgacca 420
tcaacacctt gagaggcgtg aagtcctgcc acacgggcat caaccgcacg gtgggcttga 480
acgtgcctgt gggctacctg gtggacagcg gccgcctctc agtgatgggc tgtgacgtgc 540
tcaaagcggg cagcgagtac ttccgggggca gctgcgtccc tggggcagga gagaccagat 600
aticggagtc cctctgtcgc ctctgccggg gcgacaccic cggggagggg gtgtgtgaca 660
agagccccct ggagcggtag tacgactaca gcggggccit ccggtgcctg gcagaaggcg 720
caggggacgt ggccctttgtg aagcacagca cggtagctga gaacacggat gggagaacac 780
tgccctcctg gggccacatg ctgatgtcac gggactttga gctgctgtgc cgggacggca 840
gccgggccag cgtcaccgag tggcagcact gccacciggc ccgggigccc gcccacgccc 900
tggtaggtccg ggccgacacc gacgcaggcc tcatcttccg gctttctaat gagggccagc 960
ggctgttcag ccacgagggc agcagcttcc agatgttcag ctccggaggcc tacggccaga 1020
agaacctgtc gttaaagac tccacgcagg agctggigcc catcgccaca cagacctacg 1080

```





```

aggcctggct gggccccgag taccigcacg ccatgaaggg tctgctctgt gaccccaacc 1140
ggctgcccc atacctgcgc tggtagctgc tgtccacccc cgagatccag aagtgtggag 1200
acatggccgt ggccttcagc cggcagaggc tcaagccgga gatccagtg gtctcggcgg 1260
agcccccca gcacigcatg gagcagatcc aggctgggca catcgaigct gtgacctga 1320
acggggagga caaacacaca gcggggaaga cttaagggt gatcccggt gccggggagc 1380
tgtatgccgc ggacgacagg agtaactcgt acttcgttgt ggccgtggig aagcgagaca 1440
gcgcctacgc ctacacgtg gacgagctgc gcgggaagcg ctctgccac cccggcttcg 1500
gcagcccggc cggctgggac gtcccggttg gcgcctcat ccactggggc tacatccggc 1560
ccaggaactg cgacgtctc acagcggigg gtcagtctt caacgccagc tgtgtgccgg 1620
tgaacaacc caagaaglac cctcctcgc tgtgcgcact ctgcgtgggt gacgagcagg 1680
gccgaacaa gtgcactggc aacagccagg agcgttacta tggcgacagt ggcgccttca 1740
ggtgccttgt ggagggtgca ggggacgttg cttcgtcaa gcacacgacc atctttgaca 1800
acacaaatgg ccacaatccc gagccgtggg ctgcccactt gaggagccag gactacgagc 1860
tgctgtgccc caacggcgcg cgagctgagg cgcaccagt tgcgcctgc aacctggccc 1920
agattccgtc ccacccgtc atggigcggc ccgacaccaa catcttcacc gtttacggac 1980
tgttgacaa ggcccaggac ctgtttggag acgaccacaa caagaacggg ttcaagatgt 2040
tcgactctc cagctaccac ggccgagacc tgctcttcaa ggacgccacg gtgcgcgtc 2100
tgctgtggg cgagaggacc acctaccagg actggctggg gccggactac gtggcggctc 2160
tggaagggat gcagtcacag cgggtgtcag gggcagccgt cggcgcccc ggggcctcgc 2220
tgtgcgct gctgccccig gctgcgggcc tctgtctgc ttcgtctga gagcagcccc 2280
gggcagctc ggccccggca ggggagcctg cgcggaagct tctgaacga gcccgcgccc 2340
tggctggatg tggttaccic ggcgagccgc gggcgcgcg tcccccg 2388

```

<210> 2

<211> 736

<212> PRT

<213> Rabbit

<400> 2

Met Arg Cys Arg Ser Ala Ala Met Trp Ile Phe Leu Ala Leu Arg Thr



1	5	10	15
Ala Leu Gly Ser Val Glu Val Arg Trp Cys Thr Ala Ser Glu Pro Glu			
20	25	30	
Gln Gln Lys Cys Glu Asp Met Ser Gln Ala Phe Arg Glu Ala Gly Leu			
35	40	45	
Gln Pro Ala Leu Leu Cys Val Gln Gly Thr Ser Ala Asp His Cys Val			
50	55	60	
Gln Leu Ile Ala Ala His Glu Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly			
65	70	75	80
Ala Ile Tyr Glu Ala Gly Lys Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly			
85	90	95	
Glu Val Tyr Asp Gln Glu Val Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val			
100	105	110	
Val Lys Arg Ser Ser Asn Val Thr Ile Asn Thr Leu Arg Gly Val Lys			
115	120	125	
Ser Cys His Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val			
130	135	140	
Gly Tyr Leu Val Asp Ser Gly Arg Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val			
145	150	155	160
Leu Lys Ala Val Ser Glu Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Ala			
165	170	175	
Gly Glu Thr Arg Tyr Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp			
180	185	190	
Thr Ser Gly Glu Gly Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr			
195	200	205	
Asp Tyr Ser Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val			
210	215	220	
Ala Phe Val Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Arg Thr			
225	230	235	240



4/19



465	470	475	480
Gly Ser Pro Ala Gly Trp Asp Val Pro Val Gly Ala Leu Ile His Trp			
	485	490	495
Gly Tyr Ile Arg Pro Arg Asn Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Gly Gln			
	500	505	510
Phe Phe Asn Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Lys Tyr Pro			
	515	520	525
Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Gln Gly Arg Asn Lys			
	530	535	540
Cys Thr Gly Asn Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Asp Ser Gly Ala Phe			
545	550	555	560
Arg Cys Leu Val Glu Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Thr			
	565	570	575
Thr Ile Phe Asp Asn Thr Asn Gly His Asn Pro Glu Pro Trp Ala Ala			
	580	585	590
His Leu Arg Ser Gln Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg			
	595	600	605
Ala Glu Ala His Gln Phe Ala Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Ser			
610	615	620	
His Ala Val Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly			
625	630	635	640
Leu Leu Asp Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn			
	645	650	655
Gly Phe Lys Met Phe Asp Ser Ser Ser Tyr His Gly Arg Asp Leu Leu			
	660	665	670
Phe Lys Asp Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Gly Glu Arg Thr Thr			
	675	680	685
Tyr Gln Asp Trp Leu Gly Pro Asp Tyr Val Ala Ala Leu Glu Gly Met			
690	695	700	





Gln Ser Gln Arg Cys Ser Gly Ala Ala Val Gly Ala Pro Gly Ala Ser

705 710 715 720

Leu Leu Pro Leu Leu Pro Leu Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ser Ser Leu

725 730 735

<210> 3

<211> 2341

<212> cDNA

<213> Human

<400> 3

```

g c g g a c t t c c   t c g g a c c c g g   a c c c a g c c c c   a g c c c g g c c c   c a g c c a g c c c   c g a c g g c g c c   60
a t g c g g g g t c   c g a g c g g g g c   t c t g i g g c t g   c t c c t g g c t c   t g c g c a c c g t   g c t c g g a g g c   120
a t g g a g g t g c   g g t g g t g c g c   c a c c t c g g a c   c a g a g c a g c   a c a a g t g c g g   c a a c a t g a g c   180
g a g g c c t t c c   g g g a a g c g g g   c a t c c a g c c c   t c c t c c t c t   g c g t c c g g g g   c a c c t c c g c c   240
g a c c a c t g c g   t c c a g c t c a t   c g c g g c c c a g   g a g g c t g a c g   c c a t c a c t c t   g g a t g g a g g a   300
g c c a t c i a t g   a g g c g g g a a a   g g a g c a c g g c   c t g a a g c c g g   t g g t g g g c g a   a g t g t a c g a t   360
c a a g a g g t c g   g t a c c t c c t a   t i a c g c c g t g   g c t g t g g t c a   g g a g g a g c t c   c c a t g t g a c c   420
a t t g a c a c c c   t g a a a g g c g t   g a a g t c c t g c   c a c a c g g g c a   t c a a t c g c a c   a g t g g g c t g g   480
a a c g t g c c c g   t g g g t a c c t   g g t g g a g a g c   g g c c g c c t c t   c g g t g a t g g g   c t g c g a t g t a   540
c t c a a a g c t g   t c a g c g a c i a   t t t t g g g g g c   a g c t g c g t c c   c g g g g g c a g g   a g a g a c c a g t   600
t a c t c t g a g t   c c c t c t g t c g   c c t c t g c a g g   g g t g a c a g c t   c t g g g g a a g g   g g t g t g t g a c   660
a a g a g c c c c c   t g g a g a g a t a   c t a c g a c t a c   a g c g g g g c c t   t c c g g t g c c t   g g c g g a a g g g   720
g c a g g g g a c g   t g g c t t t t g t   g a a g c a c a g c   a c g g i a c t g g   a g a a c a c g g a   t g g g a a g a c g   780
c t t c c c t c c t   g g g g c c a g g c   c c t g c t g t c a   c a g g a c t t c g   a g c t g c t g t g   c c g g g a t g g t   840
a g c c g g g c c g   a t g t c a c c g a   g i g g a g g c a g   t g c c a t c t g g   c c c g g g t g c c   t g c t c a c g c c   900
g t g g t g g t c c   g g g c c g a c a c   a g a t g g g g g c   c t c a t c t t c c   g g c t g c t c a a   c g a a g g c c a g   960
c g t c t g t t c a   g c c a c g a g g g   c a g c a g c t t c   c a g a t g t t c a   g c t c t g a g g c   c t a t g g c c a g   1020
a a g g a t c t a c   t c t t c a a a g a   c t c t a c c t c g   g a g c t t g t g c   c c a t c g c c a c   a c a g a c c i a t   1080
g a g g c g t g g c   t g g g c c a t g a   g t a c c t g c a c   g c c a t g a a g g   g t c t g c t c t g   t g a c c c c a a c   1140

```



cggtgcccc cctaccigcg ctggigtgtg ctctccactc ccgagatcca gaagtgtgga 1200  
 gacatggccg tggccttccg ccggcagcgc ctcaagccag agatccagtg cgtgtcagcc 1260  
 aagtcacccc aacactgcat ggagcggatc caggctgagc aggtcgacgc tgtgacccta 1320  
 agtggcgagg acatttacac ggcggggaag aagtacggcc tggttcccg cagccggcgag 1380  
 cactatgccc cggaagacag cagcaactcg tactacgtgg tggccgtggt gagacgggac 1440  
 agctcccacg ccttcacctt ggaatgagctt cggggcaagc gctccigcca cggcggtttc 1500  
 ggcagccctg caggctggga tgtccccgtg ggtgccctta ttcagagagg cttcatccgg 1560  
 cccaaggact gtgacgtcct cacagcagtg agcgagtct tcaatgccag ctgcgtgccc 1620  
 gtgaacaacc ccaagaacta cccctcctcg ctgtgtgcac tgtgcgtggg ggacgagcag 1680  
 ggccgcaaca agtgtgtggg caacagccag gagcggtatt acggctaccg cggcgccctc 1740  
 aggtgccctg tggagaatgc ggtgacgtt gccctcgta ggcacacaac cgtctttgac 1800  
 aacacaaacg gccacaattc cgagccctgg gctgtcagc tcaggctaga ggactatgaa 1860  
 ctgctgtgcc ccaacggggc ccgagccgag gtgtcccagt ttgcagcctg caacctggca 1920  
 cagataccac cccacgccgt gatggtccgg cccgacacca acatcttcac cgtgtatgga 1980  
 ctgctggaca agggccagga cctgtttgga gacgaccaca ataagaacgg gttaaaaatg 2040  
 ttgactcct ccaactatca tggccaagac ctgcttttca aggatgccac cgtccggggc 2100  
 gtgcctgtcg gagagaaaac cactaccgc ggtcggctgg ggcaggacta cgtggcggcg 2160  
 ctggaaggga tgtcgtctca gcagtgtcg ggcgcagcgg ccccggcgcc cggggcgccc 2220  
 ctgctcccg tgtgtgtgcc cggcctcgcc gccgcctgc tcccgccgc cctctgagcc 2280  
 cggccgcccc gccccagagc tccgatgcc gcccggggag ttccgcggc ggctctctgc 2340  
 gctgcggaat ccagaaggaa gctcgca 2368

<210> 4

<211> 738

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

Met Arg Gly Pro Ser Gly Ala Leu Trp Leu Leu Leu Ala Leu Arg Thr

1

5

10

15



Val Leu Gly Gly Met Glu Val Arg Trp Cys Ala Thr Ser Asp Pro Glu  
                     20                    25                    30  
 Gln His Lys Cys Gly Asn Met Ser Glu Ala Phe Arg Glu Ala Gly Ile  
                     35                    40                    45  
 Gln Pro Ser Leu Leu Cys Val Arg Gly Thr Ser Ala Asp His Cys Val  
                     50                    55                    60  
 Gln Leu Ile Ala Ala Gln Glu Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly  
                     65                    70                    75                    80  
 Ala Ile Tyr Glu Ala Gly Lys Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly  
                     85                    90                    95  
 Glu Val Tyr Asp Gln Glu Val Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val  
                     100                    105                    110  
 Val Arg Arg Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys Gly Val Lys  
                     115                    120                    125  
 Ser Cys His Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val  
                     130                    135                    140  
 Gly Tyr Leu Val Glu Ser Gly Arg Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val  
                     145                    150                    155                    160  
 Leu Lys Ala Val Ser Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Ala  
                     165                    170                    175  
 Gly Glu Thr Ser Tyr Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp  
                     180                    185                    190  
 Ser Ser Gly Glu Gly Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr  
                     195                    200                    205  
 Asp Tyr Ser Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val  
                     210                    215                    220  
 Ala Phe Val Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Lys Thr  
                     225                    230                    235                    240  
 Leu Pro Ser Trp Gly Gln Ala Leu Leu Ser Gln Asp Phe Glu Leu Leu



	245		250		255										
Cys	Arg	Asp	Gly	Ser	Arg	Ala	Asp	Val	Thr	Glu	Trp	Arg	Gln	Cys	His
	260		265		270										
Leu	Ala	Arg	Val	Pro	Ala	His	Ala	Val	Val	Val	Arg	Ala	Asp	Thr	Asp
	275		280		285										
Gly	Gly	Leu	Ile	Phe	Arg	Leu	Leu	Asn	Glu	Gly	Gln	Arg	Leu	Phe	Ser
	290		295		300										
His	Glu	Gly	Ser	Ser	Phe	Gln	Met	Phe	Ser	Ser	Glu	Ala	Tyr	Gly	Gln
305			310		315									320	
Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Lys	Asp	Ser	Thr	Ser	Glu	Leu	Val	Pro	Ile	Ala
	325		330		335										
Thr	Gln	Thr	Tyr	Glu	Ala	Trp	Leu	Gly	His	Glu	Tyr	Leu	His	Ala	Met
	340		345		350										
Lys	Gly	Leu	Leu	Cys	Asp	Pro	Asn	Arg	Leu	Pro	Pro	Tyr	Leu	Arg	Trp
	355		360		365										
Cys	Val	Leu	Ser	Thr	Pro	Glu	Ile	Gln	Lys	Cys	Gly	Asp	Met	Ala	Val
	370		375		380										
Ala	Phe	Arg	Arg	Gln	Arg	Leu	Lys	Pro	Glu	Ile	Gln	Cys	Val	Ser	Ala
385			390		395									400	
Lys	Ser	Pro	Gln	His	Cys	Met	Glu	Arg	Ile	Gln	Ala	Glu	Gln	Val	Asp
	405		410		415										
Ala	Val	Thr	Leu	Ser	Gly	Glu	Asp	Ile	Tyr	Thr	Ala	Gly	Lys	Lys	Tyr
	420		425		430										
Gly	Leu	Val	Pro	Ala	Ala	Gly	Glu	His	Tyr	Ala	Pro	Glu	Asp	Ser	Ser
	435		440		445										
Asn	Ser	Tyr	Tyr	Val	Val	Ala	Val	Val	Arg	Arg	Asp	Ser	Ser	His	Ala
	450		455		460										
Phe	Thr	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Gly	Lys	Arg	Ser	Cys	His	Ala	Gly	Phe
465			470		475									480	





Gly Ser Pro Ala Gly Trp Asp Val Pro Val Gly Ala Leu Ile Gln Arg  
 485 490 495  
 Gly Phe Ile Arg Pro Lys Asp Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Glu  
 500 505 510  
 Phe Phe Asn Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro  
 515 520 525  
 Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Gln Gly Arg Asn Lys  
 530 535 540  
 Cys Val Gly Asn Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Arg Gly Ala Phe  
 545 550 555 560  
 Arg Cys Leu Val Glu Asn Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Arg His Thr  
 565 570 575  
 Thr Val Phe Asp Asn Thr Asn Gly His Asn Ser Glu Pro Trp Ala Ala  
 580 585 590  
 Glu Leu Arg Ser Glu Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg  
 595 600 605  
 Ala Glu Val Ser Gln Phe Ala Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Pro  
 610 615 620  
 His Ala Val Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly  
 625 630 635 640  
 Leu Leu Asp Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn  
 645 650 655  
 Gly Phe Lys Met Phe Asp Ser Ser Asn Tyr His Gly Gln Asp Leu Leu  
 660 665 670  
 Phe Lys Asp Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Gly Glu Lys Thr Thr  
 675 680 685  
 Tyr Arg Gly Trp Leu Gly Leu Asp Tyr Val Ala Ala Leu Glu Gly Met  
 690 695 700  
 Ser Ser Gln Gln Cys Ser Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ala Pro



705                      710                      715                      720  
Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Ala Leu Ala Ala Arg Leu Leu Pro Pro  
                         725                      730                      735

Ala Leu

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

ggctggaacg tgcccgtggg cta

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

gtcctggggc ttgtccagca gtc

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

agagggactc cgagtatctg gtctc

<210> 8

<211> 24

<212> DNA



.

.

.

.

.

.

.

.

<213> Artificial Sequence

<400> 8

gtccggcccg acaccaacat cttc

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

ggtgtgttga ggggcgtgga ctct

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

tcaccaacgg ctttgagcac atcac

<210> 11

<211> 614

<212> RNA

<213> Mouse

<400> 11

tcaccaacgg ctttgagcac atcacagccc atcactgaca gatggccgct ctctacgagg 60  
taaccgacag gcacgttcca gcccacagtc cggttaatgc ctgtgtggca ggacttgacg 120  
cccctcaggg tgttgatggt aacattggaa ttcttcttga ccacagccac ggcataatag 180  
gaagtcccaa tgtcttggic atagacttcc cccaccactg gcttcaggcc gtgciccttc 240  
cctgcctcat agatggcccc tccatccagg gtgatggcat ctgctttttg ttctttagatg 300  
agctggacac agtgggcagc ggagtigccc tggacgcaga gaagggaagg acgaatgcca 360



gctccctgga aggcctcgct catgtctttg cacttctgct gctctgcgtc tgagatggta 420  
 caccactgca cctccatcac acagacgaca gtcgcaggg acaggagtag ccaaaaagtc 480  
 acgctcagga gccatcaggc aacgttgggt tggctggggt gctggcgggt ctgtcctggc 540  
 ttctcttccc ctggctcttc tggccttcac tatttaagcg cagcccgggg agagtccacg 600  
 cccctcaaca cacc 614

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

tgctacttca tgcaccc

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

aaagacctcc cctccatct

<210> 14

<211> 4158

<212> cDNA

<213> Mouse

<400> 14

ggtgtgttga ggggcgtgga ctctccccgg gctgcgctta aatagtgaag gccagagaga 60  
 ccagggaaga ggaagccagg acagaccgc cagcacccea gccaaccaa cgttgccatg 120  
 aggctcctga gcgtgacttt ttggctactc ctgtccctgc gcactgtcgt ctgtgtgatg 180  
 gaggtgcagt ggtgtacct ctcagacgca gagcagcaga agtgcaaaga catgagcgag 240





gccttccagg gagctggcat tcgtccctcc ctctctctcg tccagggcaa ctccgctgac 300  
cacigtgtcc agctcatcaa ggaacaaaaa gcagaigcca tcaccttgga tggagggggcc 360  
atctatgagg caggggaagga gcacggcctg aagccagtgg tgggggaagt ctatgaccaa 420  
gacatigggg ctctctatta tggcggtggc gtgggtcagga ggaattccaa tgttaccatc 480  
aacacccctga agggcgicaa gtccigccac acaggcatta accggactgt gggctggaac 540  
gigccctgtc gtaccctgt agagagcggc catctgtcag tgatgggctg tgaigtgtc 600  
aaagccgttg gtgattatt tggaggcagc tgtgtccctg gaacaggaga aaccagccat 660  
tccgagtcct ctgtctgctt ctgcccgtgg gactcttctg ggcacaatgt gtgtgacaag 720  
agtcctctag agagatacta cgactacagt ggagccctcc ggtgcctggc ggaaggagcc 780  
ggtagctgg ccctctgtaa gcacagcaca gtgcigggaa atacigtatg aaacacccctg 840  
ccctccctgg gcaagtcctt gatgtcagag gacttccagc tactatgcag ggaiggcagc 900  
cgagccgaca tcactgagt gagacgttc cacttggcca aggtgcctgc tcatgctgtg 960  
gtgggtcagg gtgacatgga tggcggcttc atattccaac tgctcaacga aggccagctt 1020  
ctgttcagcc acgaagacag cagcttccag atgttcagct ccaaagccia cagccagaag 1080  
aacttgcctg tcaaagactc cacttggag ctgtgtccca ttgccacaca gaactacgag 1140  
gccctggctg gccaggaata cctgcaggcc atgaaggggc tctctgtga tcccaaccgg 1200  
ctgccccact accctgcctg gtgtgtgtgt tcagcgcccg agatccagaa gtgtggagat 1260  
atggctgtgg ccttcagccg ccagaatctc aagccggaaa ttcagtggtg gtccggccgag 1320  
tccccigagc acigtatgga gcagatccag gtctgggcaca ctgacgtgt gactctgagg 1380  
ggcgaggaca ttacagggc aggaaggtg tacggcctgg ttcggcggc cggggagctg 1440  
tatgtgagg aggacaggag caattctac ttgtgtgtg ctgtggcaag aaggacagc 1500  
tcttactctt tcacctgga cgagcttgc ggcaagcgtt cctgccaccc ctacttgggc 1560  
agcccagcgg gtctggagggt gcccatcggc tccctcatcc agcggggctt catccggccc 1620  
aaggactgt atgtctcac agcgtgagc cagtcttca atgccagct cgtgcctgtc 1680  
aacaacctta agaactacc ttcgcacta tgtgcgtct gcgtgggaga cgagaagggc 1740  
cgcaacaaat gtgtggggag cagccaggag agatactacg gctacagcgg ggccttcagg 1800  
tgcttgtgg agcatgcagg ggacgtggct ttcgtcaagc acacgactgt ctttgagaac 1860  
acaaatggct acaatctga gccttgggt tctcaccica ggtggcaaga ctatgaacta 1920  
ctgtgcccc aatggggcac ggctgaggta gaccagtcc aagcttgcaa cctggcaca 1980



atgccatccc acgcigtcat ggiccgtcca gacaccaaca tcttcactgt gtaatggactt 2040  
ciggacaagg cccaggacct gtttggagac gaccataaca agaacggitt ccaaatgttt 2100  
gactcccca aatatcacag ccaagacctg cttttcaaag atgctacagt ccgagcgggtg 2160  
ccagtcgggg agaaaaccac ataccitggac tggctgggtc ctgactatgt ggttgcgcig 2220  
gaggggatgt tgtctcagca gtgctccgtt gcagggggccg cggtcagcgc agtccccctg 2280  
ctggccccgc tctgtctgac cctggctgca ggcttccctc ctgcgttct ctgaagaccg 2340  
cigtctcagg ccacgcccag agcagggaaa gctacagagc tcaaccggaa gaaaccagga 2400  
catcagctaa ccttgcagga gagcgcgggg cgggatgagg agaggcaagg tgagaactca 2460  
cacacacaca caagcctccg aggtgcgatt ctaacccaaa gagaaatttc tagaatcagg 2520  
atgatigtta aggccaagtc tccccacttg ctggagccct caataacctga ggcgactggc 2580  
gagtagccca gtcactctc ccacaccggt ggccgacagca gcgaacctgt gcctcccacc 2640  
tggagcctcc tggctggctg ggggtggtta gggggggggg gggagagtga agatgctggt 2700  
tgccatggca accgiggagc agcttccagc ctctgtaccg gccacctggt gagatgccaa 2760  
ggaaggagca caccaccaac ctagggaacc tgtgcgacac actaccacc agcagccct 2820  
gctctgcctg cccaccgct ctctcctatg ggcactgtc caccaaggcc acaccgtcgg 2880  
aggggcaagg ctgtcagca catcagccct ctgatgtgac accaaccaag gagcccagcc 2940  
ctctggacag caagattttg ctgactggg atgggaggaa ggccagagct gtactgtggg 3000  
gatgaagtc tccaaaacc tcagaggaag gaagtgcctc cacttccca ttaagaatgt 3060  
tagtgtgtga gaaacttgat gcagggtgga aactatctg tttaacggct cccgtggcaa 3120  
gcaggacttg cgctgtctgc gctgccgtga cctcactgca caatgaaact gttgccgaga 3180  
ttctattgtt tgcctctctg gtctcagct caacattagt tttctccctg cttcatata 3240  
ccccctccca catcaccag caagcacgca cgcgcacacg cacacgcaca caccitatcc 3300  
gtgtgaacat atctgaacat atctgcttgt ctgaagaagt aggagctaac caaaataac 3360  
ttcctgtcat gagctgggcc ttgggatata ccacgagcca ggggatggg gagagccctg 3420  
tcttcccttc accctgcacc tgttgggcag ttgcacttt cgagaggatc cctggttctc 3480  
tcgaactgtg agagccaagg cctaggctgc catcttgcca ttgttctctc gagaaccaga 3540  
aaaagtittc caaagctacc agctcttacc ccagatcttg ttcctttaa aaaaagtaat 3600  
aaataaaaag gagaagaaac aggagcaaac agccatctg agcacactgg aagcagcgtg 3660  
ggccgggagc tatttgtgtc ttggtctgtg tggggggcct cagatcccaa tgacaggcca 3720



.

.

.

.

```

ggttcccaagt ggctcgcccc caccigtggg cgacgacggg acagatcctt tccatggctc 3780
accagtagag aaggctcctgg cagtgtccca gccagagica cacaatcctg aggaaaaatcg 3840
gtcaccaatgg tgcitgggag agcaagcccc tcttctctcc agtacacagc catccattct 3900
tctctgagct ggggacttca cagtgagaag tgtactctgt gtgggcgact gtgtgtccca 3960
aagtgtgatg tctgtgccgt gtgcctttca gggtgtgactt tgaagagcgt tgtgtaaatg 4020
acgtctgatt gccatgggcc actgtctgtgt ttgtgtctaaa gaaagacatt gglttctttt 4080
taaaataaag ccatatatcc ctgcatacgc agaggcttgg atcctgggtg aaaaaaaaaa 4140
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa                                     4158

```

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 737

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 15

```

Met Arg Leu Leu Ser Val Thr Phe Trp Leu Leu Leu Ser Leu~Arg Thr
  1              5              10              15
Val Val Cys Val Met Glu Val Gln Trp Cys Thr Ile Ser Asp Ala Glu
      20              25              30
Gln Gln Lys Cys Lys Asp Met Ser Glu Ala Phe Gln Gly Ala Gly Ile
      35              40              45
Arg Pro Ser Leu Leu Cys Val Gln Gly Asn Ser Ala Asp His Cys Val
      50              55              60
Gln Leu Ile Lys Glu Gln Lys Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly
      65              70              75              80
Ala Ile Tyr Glu Ala Gly Lys Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly
      85              90              95
Glu Val Tyr Asp Gln Asp Ile Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val
      100             105             110
Val Arg Arg Asn Ser Asn Val Thr Ile Asn Thr Leu Lys Gly Val Lys

```



115	120	125	
Ser Cys His Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val			
130	135	140	
Gly Tyr Leu Val Glu Ser Gly His Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val			
145	150	155	160
Leu Lys Ala Val Gly Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Thr			
165	170	175	
Gly Glu Thr Ser His Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp			
180	185	190	
Ser Ser Gly His Asn Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr			
195	200	205	
Asp Tyr Ser Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val			
210	215	220	
Ala Phe Val Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Asn Thr			
225	230	235	240
Leu Pro Ser Trp Gly Lys Ser Leu Met Ser Glu Asp Phe Gln Leu Leu			
245	250	255	
Cys Arg Asp Gly Ser Arg Ala Asp Ile Thr Glu Trp Arg Arg Cys His			
260	265	270	
Leu Ala Lys Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg Gly Asp Met Asp			
275	280	285	
Gly Gly Leu Ile Phe Gln Leu Leu Asn Glu Gly Gln Leu Leu Phe Ser			
290	295	300	
His Glu Asp Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Lys Ala Tyr Ser Gln			
305	310	315	320
Lys Asn Leu Leu Phe Lys Asp Ser Thr Leu Glu Leu Val Pro Ile Ala			
325	330	335	
Thr Gln Asn Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Gln Glu Tyr Leu Gln Ala Met			
340	345	350	





Lys Gly Leu Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro His Tyr Leu Arg Trp  
 355 360 365  
 Cys Val Leu Ser Ala Pro Glu Ile Gln Lys Cys Gly Asp Met Ala Val  
 370 375 380  
 Ala Phe Ser Arg Gln Asn Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala  
 385 390 395 400  
 Glu Ser Pro Glu His Cys Met Glu Gln Ile Gln Ala Gly His Thr Asp  
 405 410 415  
 Ala Val Thr Leu Arg Gly Glu Asp Ile Tyr Arg Ala Gly Lys Val Tyr  
 420 425 430  
 Gly Leu Val Pro Ala Ala Gly Glu Leu Tyr Ala Glu Glu Asp Arg Ser  
 435 440 445  
 Asn Ser Tyr Phe Val Val Ala Val Ala Arg Arg Asp Ser Ser Tyr Ser  
 450 455 460  
 Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Pro Tyr Leu  
 465 470 475 480  
 Gly Ser Pro Ala Gly Trp Glu Val Pro Ile Gly Ser Leu Ile Gln Arg  
 485 490 495  
 Gly Phe Ile Arg Pro Lys Asp Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Gln  
 500 505 510  
 Phe Phe Asn Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro  
 515 520 525  
 Ser Ala Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Lys Gly Arg Asn Lys  
 530 535 540  
 Cys Val Gly Ser Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Ser Gly Ala Phe  
 545 550 555 560  
 Arg Cys Leu Val Glu His Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Thr  
 565 570 575  
 Thr Val Phe Glu Asn Thr Asn Gly His Asn Pro Glu Pro Trp Ala Ser



580 585 590  
His Leu Arg Trp Gln Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg  
595 600 605  
Ala Glu Val Asp Gln Phe Gln Ala Cys Asn Leu Ala Gln Met Pro Ser  
610 615 620  
His Ala Val Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly  
625 630 635 640  
Leu Leu Asp Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn  
645 650 655  
Gly Phe Gln Met Phe Asp Ser Ser Lys Tyr His Ser Gln Asp Leu Leu  
660 665 670  
Phe Lys Asp Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Arg Glu Lys Thr Thr  
675 680 685  
Tyr Leu Asp Trp Leu Gly Pro Asp Tyr Val Val Ala Leu Glu Gly Met  
690 695 700  
Leu Ser Gln Gln Cys Ser Gly Ala Gly Ala Ala Val Gln Arg Val Pro  
705 710 715 720  
Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Thr Leu Ala Ala Gly Leu Leu Pro Arg  
725 730 735  
Val Leu



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79, C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79, C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN) EMBASE (STN)  
MEDLINE (STN)  
BIOSIS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	ROSE, Timothy M. et al, 'Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence', Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. , 1986, Vol.83, No.5, pp.1261-1265	16 1-12
Y A	FOOD, Michael R. et al, 'Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidyl-inositol-anchored protein', The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol.269, No.4, pp.3034-40	16 5-7,10
PA	NAKAMASU, Kazuko et al, 'Membrane-bound transferrin-like protein(MTf): structure, evolution and selective expression during chondrogenic differentiation of mouse embryonic cells', Biochimica et Biophysica Acta, 28.10.1999, Vol.1447, No.2-3, pp.258-264	1-15
A	KAWAMOTO, Takeshi et al, 'Expression of membrane-bound transferrin-like protein p97 on the cell surface of chondrocytes', European Journal of Biochemistry, 1998, Vol.256, No.3, pp.503-509	1-15
A	EP, 635518, A1 (HOECHST JAPAN LIMITED),	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
07 November, 2000 (07.11.00)

Date of mailing of the international search report  
21 November, 2000 (21.11.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	25 January, 1995 (25.01.95) & JP, 7-82297, A  TRIPPEL, Stephen B, 'Growth factor actions on articular cartilage', The Journal of Rheumatology, 1995, No.22:1, Supplement 43	9

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05590

## Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The inventions as set forth in claims 1 to 10 of the present application pertain to chondrogenesis promoters containing as the active ingredient MTf or DNA encoding MTf.

The inventions as set forth in claims 11 and 12 of the present application pertain to chondral differentiation inhibitors containing an MTf antagonist. The active ingredient of these chondral differentiation inhibitors is different from MTf as described in claim 1. Moreover, these chondral differentiation inhibitors are used for inhibiting chondrogenesis, i.e., being contrary to claim 1. Such being the case, this group of inventions and the group of the inventions as set forth in claims 1 to 10 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The inventions as set forth in claims 13 to 15 of the present application pertain to a method of screening a substance activating MTf; the substance activating MTf obtained by the above screening method; and chondrogenesis promoters containing the above substance. Since these inventions are considered as an invention of a screening method, which falls within a category differing from the medicines containing MTf as the active ingredient as set forth in claim 1, and claims depending thereon, this group of inventions and the group of the inventions as set forth in claims 1 to 10 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The invention as set forth in claim 16 of the present application pertains to MTf with the deletion of the GPI anchor domain. Since this invention is an invention of a protein per se with unspecified use, etc., this invention and the invention of medicines as set forth in claim 1 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79, C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K45/00, 38/40, 48/00, 31/7088, 35/32, A61P19/02, C07K14/47, 14/79, C12Q1/02, G01N33/50, 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2000年
日本国登録実用新案公報	1994-2000年
日本国実用新案登録公報	1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)	EMBASE (STN)
MEDLINE (STN)	
Biosis (STN)	

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	ROSE, Timothy M. et al, 'Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97(melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence', Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. , 1986, Vol.83, No.5, pp1261-1265	16 1-12
Y A	FOOD, Michael R. et al, 'Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidyl-inositol-anchored protein', The Journal of Biological Chemistry, 1994, Vol.269, No.4, pp3034-40	16 5-7, 10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 11. 00

国際調査報告の発送日

21.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

4C 2938

電話番号 03-3581-1101 内線 6460

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	NAKAMASU, Kazuko et al, 'Membrane-bound transferrin-like protein(MTf): structure, evolution and selective expression during chondrogenic differentiation of mouse embryonic cells', Biochimica et Biophysica Acta. 28.10.1999, Vol.1447, No.2-3, pp258-264	1-15
A	KAWAMOTO, Takeshi et al, 'Expression of membrane-bound transferrin-like protein p97 on the cell surface of chondrocytes', European Journal of Biochemistry, 1998, Vol.256, No.3, pp503-509	1-15
A	EP,635518,A1 (HOECHST JAPAN LIMITED) 25.1月.1995(25.01.95) & JP,7-82297,A	1-15
A	TRIPPEL, Stephen B, 'Growth factor actions on articular cartilage', The Journal of Rheumatology, 1995, No.22:1, Supplement43	9

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

本願の請求の範囲 1-10 に記載された発明は、MT f または MT f をコードする DNA を有効成分として含有する軟骨形成促進剤である。

本願の請求の範囲 11-12 に記載された発明は、MT f のアンタゴニストを含む軟骨分化抑制剤であり、有効成分が請求の範囲 1 に記載の MT f と異なり、さらに用途も請求の範囲 1 とは相反した軟骨の形成抑制に関するものであるため、請求の範囲 1-10 に記載の発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

本願の請求の範囲 13-15 に記載された発明は、MT f を活性化する物質のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られた物質、及び該物質を含む軟骨形成促進剤であり、当該発明は請求の範囲 1 に記載の発明である MT f を有効成分とする医薬とは異なるカテゴリーに属するスクリーニング方法の発明とその従属項であると認められるので、請求の範囲 1-10 に記載の発明と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には該当しない。

そして、本願の請求の範囲 16 に記載された発明は、GPI アンカー領域を欠損した MT f であるが、当該発明は用途等の特定がされていないタンパク質自体の発明であるため、請求の範囲 1 に記載された発明である医薬と単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

